

**Charakterisierung
des humanen Proteins MCM8
und seiner Interaktion mit CDC45**

DISSERTATION

Zur Erlangung des Grades
- Doktor der Naturwissenschaften -
der Fakultät für Biologie, Chemie
und Geowissenschaften
der Universität Bayreuth

vorgelegt von
Diplom-Biologin

Linda Holtkamp

Bayreuth, 2011

Diese Arbeit wurde von September 2005 bis Juni 2009 unter Anleitung von Prof. Dr. Georg Lipps am Lehrstuhl für Biochemie der Universität Bayreuth und am Fritz-Lipmann-Institut bei Dr. Helmut Pospiech in der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Frank Grosse in Jena angefertigt.

Vollständiger Abdruck der von der Fakultät für Biologie, Chemie und Geowissenschaften der Universität Bayreuth genehmigten Dissertation zur Erlangung des akademischen Grades Doktor der Naturwissenschaften (Dr. rer. nat.).

Promotionsgesuch eingereicht am: 08.03.2011

Tag des wissenschaftlichen Kolloquiums: 22.11.2011

Prüfungsausschuss:

Prof. Dr. Georg Lipps	(Erstgutachter)
Prof. Dr. Franz-Xaver Schmid	(Zweitgutachter)
Prof. Dr. Carlo Unverzagt	(Vorsitzender)
Prof. Dr. Wolfgang Schumann	

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung.....	1
1.1. Zellzyklus der Eukaryoten.....	1
1.2. DNA-Replikation der Eukaryoten.....	2
1.2.1. Die Bildung des präreplikativen Komplexes.....	2
1.2.2. Die Umwandlung des präreplikativen Komplexes in den Initiationskomplex	3
1.2.3. Replikation der DNA.....	4
1.3. Helikasen und MCM-Proteine.....	6
1.3.1. Helikasen.....	6
1.3.2. MCM-Proteine.....	7
1.3.3. MCMs der Archaea.....	8
1.3.4. MCM2-7.....	10
1.3.5. MCM8.....	12
1.4. CDC45 und GINS.....	14
1.5. Problemstellung.....	16
2. Materialien und Methoden.....	17
2.1. Materialien.....	17
2.1.1. Bakterienstämme.....	17
2.1.2. Hefezellstämme.....	17
2.1.3. Insektenzelllinien.....	18
2.1.4. Humane Zelllinien.....	18
2.1.5. Verwendete und konstruierte Plasmide.....	18
2.1.6. Verwendete und generierte Baculoviren.....	20
2.1.7. Oligodesoxynukleotide.....	20
2.1.8. Einzelsträngige DNA für ATPase-Aktivitätstests.....	21
2.1.9. Chemikalien und Verbrauchsmaterialien.....	22
2.1.9.1. Allgemeine Chemikalien.....	22
2.1.9.2. Verbrauchsmaterialien.....	23
2.1.10. Chromatographiematerialien.....	24
2.1.11. Enzyme.....	24
2.1.12. Längenstandards.....	24
2.1.13. Kommerzielle Reagenziensätze und Medien, Kits.....	25
2.1.14. Antikörper.....	26
2.1.15. Geräte.....	27
2.1.16. Software.....	29
2.2. Methoden.....	30
2.2.1. Methoden im Umgang mit <i>E.coli</i>	30
2.2.1.1. Kultivierung von <i>E. coli</i>	30
2.2.1.2. Herstellung von Calciumchlorid-kompetenten <i>E.coli</i>	30
2.2.1.3. Herstellung von Rubidiumchlorid-kompetenten <i>E. coli</i>	31

2.2.1.4. Transformation von kompetenten <i>E. coli</i>	31
2.2.1.5. Expression von Protein in <i>E.coli</i>	31
2.2.1.5.1. Test auf Überexpression in 48-Well-Platte.....	31
2.2.1.5.2. Test auf Überexpression in Mini-Fermenter (bei Chaperon-Coexpression).....	32
2.2.1.5.3. Fermentation in 4L-Fermenter.....	33
2.2.1.6. Herstellung von <i>E.coli</i> -Zellextrakten.....	33
2.2.2. Methoden im Umgang mit <i>S. cerevisiae</i>	34
2.2.2.1. Kultivierung von <i>S. cerevisiae</i>	34
2.2.2.2. Herstellung von PEG-kompetenten <i>S. cerevisiae</i> (Dohmen <i>et al.</i> 1991).....	34
2.2.2.3. Transformation von <i>S. cerevisiae</i>	35
2.2.2.4. Test-Expression von Protein in <i>S. cerevisiae</i>	35
2.2.2.5. Herstellung von <i>S. cerevisiae</i> -Zellextrakt (Horvath & Riezman, 1994).....	35
2.2.3. Methoden im Umgang mit Insektenzellen.....	36
2.2.3.1. Kultivierung von Sf9-Insektenzellen.....	36
2.2.3.1.1. Auftauen.....	36
2.2.3.1.2. Kultivierung.....	36
2.2.3.1.3. Bestimmung der Zellzahl durch Trypanblau-Ausschluss.....	37
2.2.3.1.4. Einfrieren von Sf9-Zellen.....	37
2.2.3.2. Transfektion von Sf9-Zellen mit DNA für transiente Proteinexpression durch Lipofektion.....	37
2.2.3.2.1. Vorgehensweise für 24-Well-Platte.....	37
2.2.3.2.2. Vorgehensweise für 10 ml Suspensionskultur.....	38
2.2.3.3. Transfektion von Sf9-Zellen mit DNA für transiente Proteinexpression durch Calciumchlorid.....	38
2.2.3.4. Transfektion von Sf9-Zellen zur Generierung rekombinanter Baculoviren.....	39
2.2.3.5. Amplifikation rekombinanter Baculoviren.....	40
2.2.3.6. Kultivierung von HiV-Insektenzellen.....	40
2.2.3.7. Infektion von HiV-Insektenzellen mit Baculoviren zur Proteinexpression.....	40
2.2.3.8. Lyse von Insektenzellen.....	41
2.2.4. Methoden im Umgang mit HeLa-Zellen.....	42
2.2.4.1. Auftauen.....	42
2.2.4.2. Kultivierung.....	42
2.2.4.3. Synchronisation von HeLa-Zellen.....	42
2.2.4.3.1. Mimosin-Block.....	43
2.2.4.3.2. Thymidin-Block.....	43
2.2.4.4. Herstellung von HeLa-Zellextrakten.....	44
2.2.4.4.1. Fraktionierte Zellextrakte.....	44
2.2.4.4.2. Zellextrakte für die Immunopräzipitation von MCM8 und CDC45.....	45
2.2.4.5. Durchflusszytometrische Analyse von HeLa-Zellen (FACS-Analyse).....	45
2.2.5. Molekularbiologische Methoden.....	47
2.2.5.1. Klonierung.....	47

2.2.5.1.1. Polymerasekettenreaktion (PCR).....	47
2.2.5.1.2. Quickchange-Mutagenese.....	47
2.2.5.1.3. Spaltung mit Restriktionsenzymen.....	48
2.2.5.1.4. Enzymatische Dephosphorylierung.....	48
2.2.5.1.5. Ligation.....	48
2.2.5.2. Isolierung und Reinigung von DNA.....	48
2.2.5.2.1. Phenol-Chloroform-Extraktion von DNA.....	48
2.2.5.2.2. Isolierung doppelsträngiger Plasmid-DNA mit Kit.....	49
2.2.5.2.3. Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarose-Gelen.....	49
und PCR-Ansätzen.....	49
2.2.5.2.4. Bestimmung der Konzentration von DNA.....	49
2.2.6. Proteinbiochemische Methoden.....	50
2.2.6.1. Säulenchromatographie.....	50
2.2.6.1.1. Puffer.....	50
2.2.6.1.2. Analytische Mini-Chromatographie.....	51
2.2.6.1.3. Präparative Affinitätschromatographie.....	51
2.2.6.1.4. FPLC-gestützte Heparin-Chromatographie.....	53
2.2.6.1.5. Ionenaustauschchromatographie.....	53
2.2.6.2. Gelfiltration.....	54
2.2.6.3. Ultrafiltration zur Konzentrierung von Proteinen.....	54
2.2.6.4. Dialyse von Proteinen aus <i>E. coli</i>	54
2.2.6.5. Spektralphotometrische Proteinkonzentrationsbestimmung.....	55
2.2.6.6. Bradford-Test.....	55
2.2.6.7. Rückfaltung von denaturiertem Protein (Vincentelli <i>et al.</i> , 2004).....	55
2.2.6.8. Glyceringradientenzentrifugation.....	56
2.2.6.9. Thrombin-Verdau.....	56
2.2.7. Elektrophoretische Methoden.....	57
2.2.7.1. Agarose-Gelelektrophorese (DNA-Analyse).....	57
2.2.7.1.1. Detektion von DNA mittels Ethidiumbromid.....	57
2.2.7.1.2. Detektion von DNA mittels SYBR-Safe.....	57
2.2.7.2. Diskontinuierliche SDS-PAGE nach Schaeffer und v. Jagow (Protein-Analyse).....	57
2.2.7.3. Diskontinuierliche SDS-PAGE nach Laemmli (Protein-Analyse).....	58
2.2.7.4. Detektion von Proteinen in Gelen.....	58
2.2.7.4.1. Coomassie-Färbung.....	58
2.2.7.4.2. Western-Blot.....	59
2.2.8. Untersuchungen der Proteinaktivität durch Bestimmung der ATPase-Aktivität.....	61
2.2.8.1. Hybridisierung von DNA	61
2.2.8.2. ATPase-Assay.....	61
2.2.9. Identifizierung von Protein-Protein Interaktionen durch Co-Immunopräzipitation.....	62

2.2.9.1. Immunopräzipitation mit magnetischen Partikeln.....	62
2.2.9.2. Immunopräzipitation mit GammaBind Plus Sepharose.....	62
3. Ergebnisse und Diskussion.....	64
3.1. Expression von MCM8 in <i>Escherichia coli</i>	64
3.1.1. Löslichkeits- und Überexpressionsexperimente.....	65
3.1.1.1. Expression von MCM8 in <i>E. coli</i> BL21 (DE3) CodonPlus und Rosetta 2 (DE3) pLysS.....	65
3.1.1.2. Verbesserung der Expression in Gegenwart von Glucose.....	66
3.1.1.3. Erhöhung der Löslichkeit durch Variierung der IPTG-Konzentration und der Expressionstemperatur.....	67
3.1.2. Untersuchung von H6_MCM8 und der Walker-A-Motiv-Mutante H6_MCM8 K460E..	68
3.1.3. Aufreinigung von denaturiertem H6_MCM8 und Rückfaltung.....	72
3.1.3.1. Aufreinigung.....	72
3.1.3.2. Rückfaltung.....	72
3.1.3.3. Dialyse und Aktivitätsbestimmung von rückgefaltetem H6_MCM8.....	74
3.1.4. Co-Expression von MCM8 und Chaperonen in <i>E. coli</i> BL21 (DE3).....	75
3.1.4.1. Untersuchung von H6_MCM8, MCM8_H6 und MCM8_H6 K460E nach Co-Expression von <i>E. coli</i> Triggerfaktor.....	76
3.1.4.2. Glyceringradienten-Zentrifugation von H6_MCM8.....	80
3.1.4.3. Entfernung des His-Tags von H6_MCM8 durch Thrombin-Verdau.....	80
3.1.4.4. Untersuchung einer möglichen positiven Kooperativität von H6_MCM8 im Bezug auf ATP.....	81
3.1.5. Zusammenfassung MCM8 aus <i>E. coli</i>	83
3.2. Expression von MCM8 in <i>S. cerevisiae</i>	84
3.3. Expression von MCM8 in Insektenzellen.....	85
3.3.1. Transiente Expression von MCM8 in Sf9-Insektenzellen.....	85
3.3.1.1. Expressionssystem.....	85
3.3.1.2. Transfektionstests.....	85
3.3.1.3. Bestimmung der optimalen Expressionszeit sowie der Löslichkeit von H10_MCM8.....	86
3.3.1.4. Untersuchung von H10_MCM8 und H10_MCM8 K460E.....	87
3.3.2. Baculovirus-vermittelte Expression von MCM8 in HiV-Zellen.....	89
3.3.2.1. Expressionssystem.....	89
3.3.2.2. Infektionstests.....	90
3.3.2.3. Untersuchung von Strep_MCM8_H10 aus HiV-Insektenzellen.....	91
3.3.3. Co-Expression von MCM8 und CDC45 in HiV-Zellen.....	93
3.3.3.1. Co-Aufreinigung von Strep_MCM8 und His_CDC45.....	93
3.3.3.2. Analytische Gelfiltration von MCM8_H10 und CDC45.....	95
3.3.3.3. Co-Immunopräzipitation von MCM8_H10 und CDC45.....	98
3.4. Interaktion von MCM8 und CDC45 in HeLa-Zellen.....	100
3.4.1. Co-Immunopräzipitation von MCM8 und CDC45 aus HeLa-Zellen.....	100

3.4.2. Auftreten von MCM8 und CDC45 in synchronisierten HeLa-Zellen, FACS-Analyse	101
4. Zusammenfassende Diskussion und Ausblick.....	104
4.1. Expression von MCM8 in <i>E. coli</i>	104
4.1.1. Humanes MCM8 wird in <i>E. coli</i> bei Coexpression von <i>E. coli</i> Triggerfaktor und einer kühlen Expressionstemperatur löslich exprimiert.....	104
4.1.2. Aufreinigung von humanem MCM8 aus <i>E. coli</i> -Zellextrakten und Co-Aufreinigung von Proteolysefragmenten.....	106
4.1.3. In <i>E. coli</i> exprimiertes humanes MCM8 besitzt keine ATPase-Aktivität.....	107
4.2. Expression von humanem MCM8 in Insektenzellen.....	110
4.2.1. Humanes MCM8 wird in Insektenzellen löslich exprimiert.....	110
4.2.2. Aufreinigung von humanem MCM8 aus Insektenzell-Extrakten.....	110
4.2.3. In Insektenzellen exprimiertes humanes MCM8 besitzt keine ATPase-Aktivität.....	111
4.3. Interaktion von MCM8 und CDC45.....	112
4.3.1. MCM8 und CDC45 co-eluierten in Affinitätschromatographie.....	112
4.3.2. MCM8 und CDC45 co-eluierten in Gelfiltration.....	112
4.3.3. MCM8 und CDC45 co-immunopräzipitieren.....	113
4.3.4. MCM8 und CDC45 assoziieren in der späten Synthese-Phase am Chromatin.....	114
4.4. Die Funktion von MCM8 im eukaryotischen Zellzyklus.....	114
4.5. Ausblick.....	115
5. Zusammenfassung.....	117
6. Summary.....	119
7. Abkürzungsverzeichnis.....	121
8. Literaturverzeichnis.....	127
9. Anhang.....	140

1. Einleitung

Die Erhaltung der Erbinformation in sich teilenden Zellen ist ein streng regulierter Prozess. Insbesondere die Duplikation der chromosomalen DNA ist für die Zellteilung von zentraler Bedeutung, da sichergestellt werden muss, dass die Replikation der DNA fehlerfrei und nur einmal während des Zellzyklus stattfindet. Dies ist sowohl für einzellige wie für höher entwickelte Organismen wichtig, da die Anhäufung von Mutationen oder chromosomalen Aberrationen unter anderem zur Entstehung von Krebszellen führen kann. Die Initiation der DNA-Replikation ist streng kontrolliert und aufgrund ihrer Bedeutung für die Grundlagenforschung, aber auch für das Verständnis von Krebszellen Gegenstand intensiver Forschung. So werden neue Proteine als essentielle Komponenten der Replikationsinitiation und DNA-Replikation aufgedeckt und das Wissen um die Prozesse erweitert, die diesen Mechanismen zugrunde liegen. Dies kann letztendlich helfen beizutragen, die unerwünschte Replikation von Krebszellen gezielt zu beeinflussen.

1.1. Zellzyklus der Eukaryoten

In eukaryotischen Zellen wird der Zellzyklus in zwei Phasen (Interphase und Teilungsphase) aufgeteilt. In der Interphase nimmt die Zelle an Masse zu und verdoppelt ihre DNA. In der Teilungsphase finden sowohl die Kernteilung (Mitose) als auch die Teilung des Cytoplasmas (Cytokinese) statt. Die Replikation der DNA während der Interphase wird in vier Phasen gegliedert und stellt ein Modell für die zeitliche Abfolge der Prozesse dar, die in wachsenden und sich teilenden eukaryotischen Zellen ablaufen (Abb. 1.1). Die Dauer dieser einzelnen Phasen ist von Zelltyp und Organismus abhängig. Mit dem Abschluss der Zellteilung beginnt die präsynthetische G1-Phase (von engl. *gap* = Lücke). Hier werden abhängig von Wachstumsfaktoren der präreplikative Komplex sowie der Initiationskomplex für die DNA-Replikation gebildet und somit die Vorbereitungen für die anschließende Synthesephase getroffen. Während der Synthesephase (S-Phase) findet die semikonservative Replikation der DNA statt. In der postsynthetischen G2-Phase bereitet sich die Zelle auf die Zellteilung vor, die in der anschließenden Mitosephase zur Entstehung zweier identischer Tochterzellen führt.

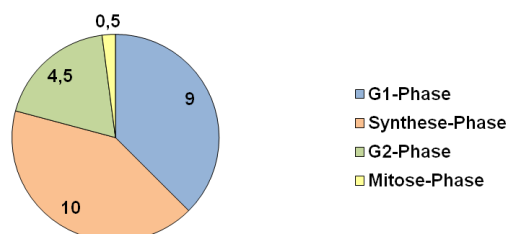


Abb. 1.1 Schematische Darstellung der Zellzyklusphasen von schnell proliferierenden humanen Zellen
Grafik erstellt nach (Lodish, 2007) Die Zahlen beschreiben die Dauer der einzelnen Phasen in Stunden.

1.2. DNA-Replikation der Eukaryoten

1.2.1. Die Bildung des präreplikativen Komplexes

Die eukaryotische DNA-Replikation beginnt an vielen Stellen des Genoms gleichzeitig, wodurch das Genom innerhalb kurzer Zeit verdoppelt werden kann. Die Startstellen der Replikation werden auch als *origins of replication* (kurz *origins*) bezeichnet. Die DNA-Replikation wurde bereits intensiv in Modellorganismen wie *Saccharomyces cerevisiae*, *Xenopus laevis* oder humanen Zellen erforscht. Es wurde gezeigt, dass zunächst ein spezifischer Proteinkomplex, der sogenannte präreplikative Komplex (pre-RC) an die *origins* bindet, der sich aus den Proteinkomplexen ORC und MCM2-7 sowie den Proteinen CDC6 und Cdt1 zusammensetzt (Abb. 1.2) (Bell & Dutta, 2002). Als erste Komponente des pre-RC bindet der ORC (*origin recognition complex*) an den *origin* (Bell & Stillman, 1992). Er besteht aus sechs Untereinheiten (Orc1 bis Orc6) und ist in allen Eukaryoten konserviert (Gavin *et al.*, 1995; Gossen *et al.*, 1995; Rowles *et al.*, 1996). Der ORC fungiert als Initiator-Komplex, welcher die weiteren Replikationsproteine an die *origins* rekrutiert. In der Regulation der DNA-Replikation spielt Orc1 eine bedeutende Rolle, da seine Expression und Chromatinbindung zellzyklusabhängig reguliert sind (Kreitz *et al.*, 2001; Ohtani *et al.*, 1996; Thome *et al.*, 2000) und dadurch auf Ebene der *origin*-Erkennung eine wiederholte Initiation der DNA-Replikation verhindert wird. Nach Bindung des ORC wird zunächst das Protein CDC6 (*Cell division cycle protein 6*) und nachfolgend Cdt1 (*CDC10 target 1*) an das Chromatin rekrutiert (Abb. 1.2) (Bell & Dutta, 2002; Lei & Tye, 2001).

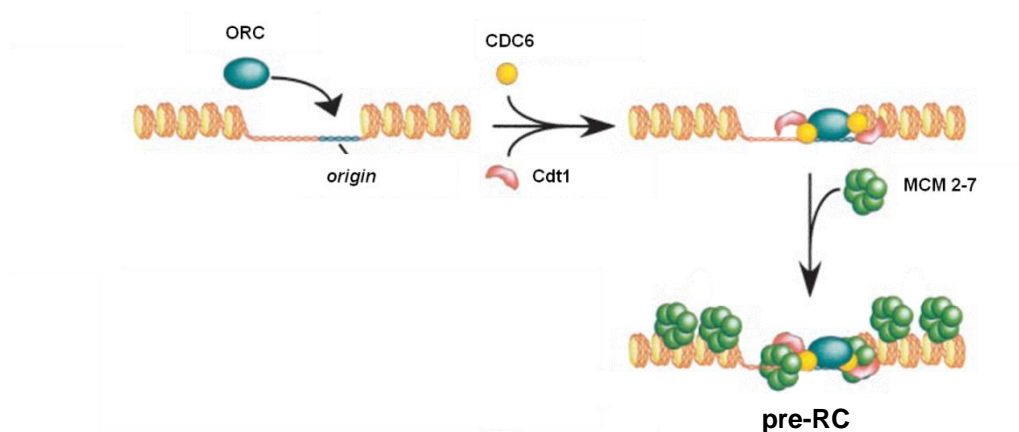


Abb. 1.2 Assemblierung des präreplikativen Komplexes (pre-RC) (Grafik abgewandelt nach Bell & Dutta 2002)

Modell der Abläufe an den Replikationsstartpunkten von der späten M- bis zur G1-Phase. Der *origin recognition complex* (ORC) bindet an den *origin of replication*. *Cell division cycle protein 6* (CDC6) und *CDC10 target 1* (Cdt1) werden zu den Replikationsstartpunkten rekrutiert. Anschließend wird der MCM2-7-Komplex geladen.

CDC6 interagiert mit dem ORC am Chromatin (Liang *et al.*, 1995). Die Synthese und Degradation von CDC6 sind zellzyklusabhängig reguliert, was ebenfalls eine wiederholte Initiation der DNA-Replikation verhindert (Drury *et al.*, 1997; Petersen *et al.*, 2000; Piatti *et al.*, 1996; Saha *et al.*, 1998a). Anschließend wird Cdt1 zum pre-RC rekrutiert. In *Xenopus* wurde das Protein MCM9 als positiver Regulator für die Rekrutierung von Cdt1 identifiziert (siehe auch Kap. 1.3.2) (Lutzmann & Mechali, 2008). Cdt1 assoziiert am *origin* mit dem C-terminus von CDC6, woraufhin anschließend der MCM2-7-

Komplex rekrutiert werden kann (Maiorano *et al.*, 2000; Nishitani *et al.*, 2000). Durch die koordinierte Aktivität von ORC, CDC6 und Cdt1 (Bell & Dutta, 2002; Blow & Dutta, 2005; Diffley, 2004) erfolgt die Assoziation des MCM2-7-Komplexes ans Chromatin, welcher in Kap. 1.3.4 genauer beschrieben wird. Durch die Bindung des Replikationsfaktors MCM10 an den *origin* am G1/S-Phasen-Übergang wird die Umwandlung des pre-RCs in den Initiationskomplex (IC) eingeleitet (Kawasaki *et al.*, 2000; Merchant *et al.*, 1997; Park *et al.*, 2008).

1.2.2. Die Umwandlung des präreplikativen Komplexes in den Initiationskomplex

Durch die Umwandlung des präreplikativen Komplexes in den Initiationskomplex wird die initiale Entwindung der DNA und damit der erste Schritt der DNA-Replikation vorbereitet (Abb. 1.3). Die Regulation dieses komplizierten Mechanismus übernehmen zum Teil cyclinabhängige Kinasen (CDKs), die durch Phosphorylierung einzelner Komponenten deren Dissoziation oder Rekrutierung vermitteln. Da diese Vorgänge bisher am besten in Hefen untersucht wurden, wird im Folgenden die Nomenklatur der Hefe-Proteine verwendet. Wo diese nicht mit den Proteinen der höheren Organismen übereinstimmen, wird an entsprechender Stelle auf die analogen Proteine der Vertebraten hingewiesen.

Zunächst wird Sld3 durch die Dbf-abhängige Kinase (DDK) phosphoryliert und bindet am *origin* (Abb. 1.3) (Yabuuchi *et al.*, 2006). Nach der Phosphorylierung von Sld2 durch die Synthese-Phase-spezifische cyclinabhängige Kinase (S-CDK) und der Interaktion von Sld2 mit der DNA-Polymerase-B-Untereinheit 11 (Dpb11) bilden Sld2/Dpb11 einen ternären Komplexes mit Sld3 und assoziieren am *origin* (Abb. 1.3) (Pospiech *et al.*, 2010; Tanaka *et al.*, 2007; Zegerman & Diffley, 2007). Ein homologes Protein zu Sld3 aus dem Menschen wurde bisher nicht identifiziert. Jedoch wird als funktionales Analogon in Vertebraten das Protein TICRR aus dem Zebrafisch diskutiert. Es wurde gezeigt, dass TICRR in entsprechender Weise mit TopBP1, dem Vertebraten-Homolog von Dpb11, interagiert (Sansam *et al.*, 2010). Sld2 zeigt Sequenzhomologien zum tierischen RecQL4-Protein (*RecQ protein like 4*) und wird in vielen Zusammenhängen als dessen Ortholog diskutiert (Matsuno *et al.*, 2006; Pospiech *et al.*, 2010; Sangrithi *et al.*, 2005). Ebenfalls durch die S-CDK wird CDC6 phosphoryliert, welches daraufhin vom Chromatin dissoziiert (Delmolino *et al.*, 2001; Piatti *et al.*, 1996). Die Phosphorylierung des MCM2-7-Komplexes durch die DDK führt zur Aktivierung des Komplexes und zur anschließenden Bindung von CDC45 und GINS an MCM2-7 (Labib, 2010; Randell *et al.*, 2010). Die Helikase-Cofaktoren CDC45 und GINS werden durch Sld2/Sld3/Dpb11 an die Replikationsstartpunkte rekrutiert und bilden dort zusammen mit MCM2-7 die aktive replikative Helikase (Abb. 1.3) (Aparicio *et al.*, 2009; Boskovic *et al.*, 2007; Moyer *et al.*, 2006). CDC45 und GINS werden in Kap. 1.4 näher beschrieben. Die Komplexe Sld2/Sld3/Dpb11 und CDC45/MCM2-7/GINS (CMG) sowie MCM10 kooperieren in der Rekrutierung der DNA-Polymerasen und des ssDNA-bindenden Replikationsfaktors A (RPA) zum Chromatin (Pospiech *et al.*, 2010), was zur Ausbildung der Replikationsgabel und der Initiation der DNA-Replikation führt (Abb. 1.3).

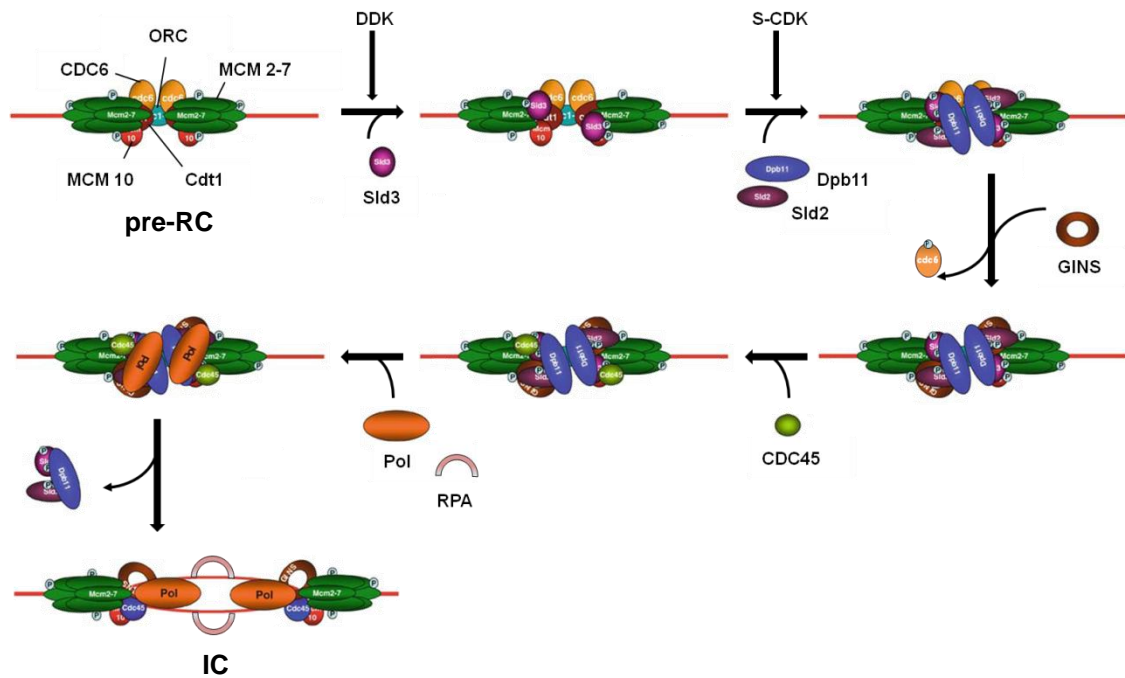


Abb. 1.3 Modell der Umwandlung des präreplikativen Komplexes (pre-RC) in den Initiationskomplex (IC)
(Grafik abgewandelt nach Pospiech *et al.*, 2010)

Die Dbf-abhängige Kinase (DDK) und die Synthese-Phase-spezifische cyclin-abhängige Kinase (S-CDK) phosphorylieren Sld2 und Sld3. Diese assoziieren zusammen mit der DNA-Polymerase-B-Untereinheit 11 (Dpb11) am *origin*. Die S-CDK phosphoryliert CDC6, welches daraufhin vom Chromatin dissoziiert. Sld2/Sld3/Dpb11 rekrutieren GINS und CDC45 zum *origin*, welche dort mit MCM2-7 interagieren und den CMG-Komplex bilden. Der ssDNA-bindende Replikationsfaktor A (RPA) wird abhängig von Sld3 und CDC45 ans Chromatin geladen. CMG und Sld2/Sld3/Dpb11 kooperieren in der Rekrutierung der DNA-Polymerasen und bewirken so die Initiation der DNA-Replikation und die daraus folgende Ausbildung der Replikationsgabel.

1.2.3. Replikation der DNA

In allen Organismen findet die Synthese der DNA in 5' → 3' Richtung statt. Auf Grund der Antiparallelität der DNA-Stränge kann so nur ein Strang kontinuierlich repliziert werden (*leading strand* = Leitstrang), während der andere Strang in einer Reihe von kurzen Abschnitten (Okazaki-Fragmenten) synthetisiert wird (*lagging strand* = Folgestrang). Ein Modell der eukaryotischen Replikationsgabel ist in Abb. 1.4 gezeigt.

Die DNA-Replikation in Eukaryoten beginnt mit der Entwindung der DNA an den Replikationsstartpunkten durch den CDC45/MCM2-7/GINS-Komplex (Gambus *et al.*, 2011) und der Synthese eines RNA-Primers durch die Primase-Untereinheit der DNA-Polymerase α (Pol α) (Frick & Richardson, 2001; Nasheuer *et al.*, 2002). Aufgrund der Fähigkeit RNA-Primer zu synthetisieren, ist die Pol α das einzige Enzym, welches die DNA-Synthese *de novo* starten kann (Agarkar *et al.*, 2011). Die Primase-Untereinheit synthetisiert kurze RNA-Primer auf dem Leitstrang sowie die Primer der Okazaki-Fragmente auf dem Folgestrang. Diese Primer werden von der Pol α zu DNA-Strängen von ca. 30-40 Nukleotiden verlängert. Durch einen „DNA-Polymerase-Switch“ genannten Prozess wird die prozessive Elongation der von der DNA-Polymerase α initiierten Stränge durch die DNA-Polymerasen δ und ϵ (Pol δ und Pol ϵ) ausgeführt (Mossi *et al.*, 2000).

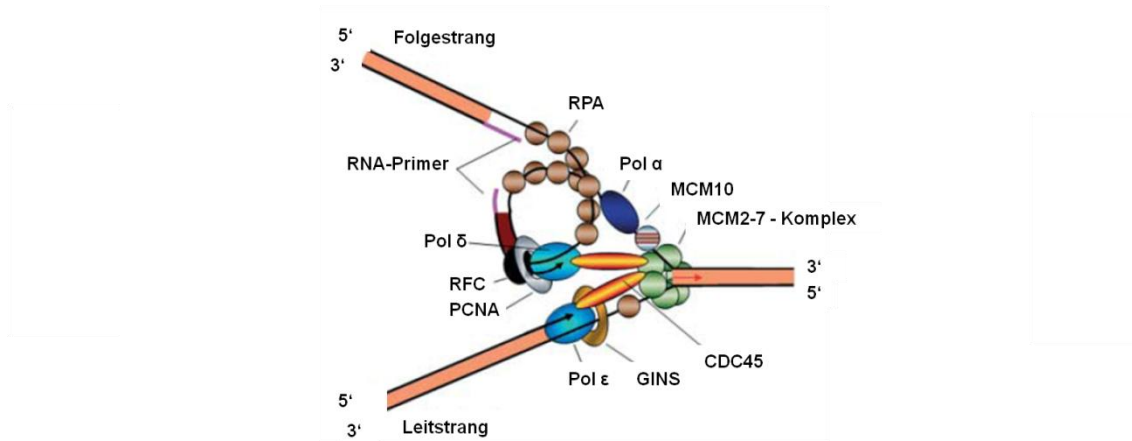


Abb. 1.4 Vereinfachtes Modell der Replikationsgabel der eukaryotischen DNA-Replikation
(Grafik abgewandelt nach Bauerschmidt *et al.*, 2007)

Damit die Pol δ an das Chromatin geladen werden kann, bilden der Replikationsfaktor C (RFC) und PCNA (*proliferating cell nuclear antigen*) eine Ladeplattform für die Pol δ (Hubscher *et al.*, 2002). PCNA ist ein homotrimeres Protein und bildet eine ringförmige Klammer um die DNA. Es erhöht die Prozessivität der DNA-Polymerasen, indem es deren verfrühte Dissoziation von der DNA verhindert (O'Donnell *et al.*, 1992; Waga & Stillman, 1998). Durch RFC wird PCNA auf das 3'-Ende des durch die Pol α synthetisierten RNA-DNA-Primers geladen (Waga & Stillman, 1998). Die Pol δ übernimmt die Elongation durch Verlängerung der Okazaki-Fragmente am Folgestrang (Burgers, 2009; Fukui *et al.*, 2004; Garg & Burgers, 2005). Zur Verbindung der Okazaki-Fragmente werden die RNA-Primer mittels Nukleasen entfernt und durch DNA ersetzt, im Anschluss werden die einzelnen Fragmente durch eine Ligase verbunden. Pol ϵ übernimmt die kontinuierliche Synthese des Leitstranges (Burgers, 2009; Pursell *et al.*, 2007). Außerdem besitzen Pol δ und Pol ϵ eine dem Korrekturlesen dienende 3'-5'-Exonuklease-Aktivität (Morrison & Sugino, 1994; Shcherbakova & Pavlov, 1996).

Für die Initiation der DNA-Replikation ist die Entwindung des DNA-Doppelstranges durch die replikative Helikase von entscheidender Bedeutung. Da in dieser Arbeit eine potentielle Helikase der MCM-Familie sowie ihre Interaktion mit dem Helikase-Cofaktor CDC45 näher charakterisiert wurde, wird im Folgenden näher auf die Helikasen und MCM-Proteine, sowie auf CDC45 und dessen Interaktionspartner eingegangen.

1.3. Helikasen und MCM-Proteine

1.3.1. Helikasen

Die Trennung von Wasserstoffbrückenbindungen komplementärer Nukleinsäurestränge wird durch Helikasen unter Verwendung zellulärer Energie katalysiert. Durch ihre Beteiligung an der DNA-Replikation (Kaplan *et al.*, 2003), der DNA-Reparatur (Donaldson *et al.*, 2006) sowie der homologen Rekombination (Knoll & Puchta, 2011) und Transkription (Timmins & McSweeney, 2006) übernehmen sie wichtige Funktionen im Nukleinsäuremetabolismus (Tuteja & Tuteja, 2004).

Helikasen werden in sechs Superfamilien (SF) aufgeteilt (Gorbalenya, 1993; Singleton *et al.*, 2007). Die Einteilung erfolgt entsprechend ihrer unterschiedlichen Sequenz und der Anzahl an Helikasemotiven. Die Helikasemotive sind kurze, hochkonservierte Sequenzabschnitte, welche in der Helikasedomäne des Proteins lokalisiert sind. Allen Helikasen gemein sind die drei Helikase-Motive A, B und R (Singleton *et al.*, 2007). Motiv A enthält ein Walker-A-Motiv (G/AxxxxGKS/T), dessen Lysinrest für die Bindung von ATP entscheidend ist. Motiv B ist das sogenannte Walker-B-Motiv (DEAD/DEAH) und koordiniert die ATP-Hydrolyse (Hanson & Whiteheart, 2005). Motiv R enthält einen „Arginin-Finger“, der die ATP-Hydrolyse mit Konformationsänderungen im Protein koppelt (Scheffzek *et al.*, 1997). Vertreter der SF1 und 2 besitzen sieben Helikasemotive und sind sowohl DNA- als auch RNA-entwindende Helikasen, die ihre Funktion als Monomer oder Dimer ausüben (Kim *et al.*, 1998; Velankar *et al.*, 1999). SF3- und SF5-Helikasen weisen drei, SF4- und SF6-Helikasen fünf Helikasemotive auf (Singleton *et al.*, 2007). Die SF3-6-Helikasen sind unter anderem an der Replikationsgabel zu finden und formen als hexamere Struktur einen Ring um die DNA (Patel & Donmez, 2006; Singleton *et al.*, 2007). Helikasen entwinden Doppelstrang (ds)-DNA, dsRNA oder DNA-RNA-Heteroduplex unidirektional in 3'-5'- oder 5'-3'-Richtung. Dieser Prozess wird als Translokation bezeichnet und ist mit der Hydrolyse des Nukleosid-5'-Triphosphats gekoppelt (Gaur, 2007). Die spezifische Polarität der Helikasen wird durch ihre initiale Bindung an das ss-Template definiert und bestimmt die Richtung ihrer Proteintranslokation. Die meisten Helikasen binden ssDNA mit höherer Affinität als dsDNA, und die Bindung der DNA ist abhängig von der Anwesenheit von ATP oder Mg^{2+} (Bochman & Schwacha, 2009; Tuteja & Tuteja, 2004).

In Eukaryoten und Archaea ist die Helikasefunktion der *minichromosome maintenance*-Proteine (MCM-Proteine) essentiell für die Replikation der genomischen DNA. Diese werden im Folgenden näher beschrieben.

1.3.2. MCM-Proteine

Die *mcm*-Gene wurden zuerst in *Saccharomyces cerevisiae* durch Mutationen in *mcm2*, *mcm3* und *mcm5* identifiziert, welche hier einen Defekt in der Erhaltung der extrachromosomalen DNA, der so genannten Minichromosomen zur Folge hatten (Maine *et al.*, 1984). Später wurden *mcm4* (ursprünglich *cdc54*), *mcm6* (ursprünglich *cdc47*) und *mcm7* (ursprünglich *mis5*) ebenfalls in Zellzyklus-defekten Mutanten der Hefe gefunden (Hennessy *et al.*, 1991; Moir *et al.*, 1982; Takahashi *et al.*, 1994).

Die eukaryotischen MCM2-7 sowie die archaealen MCM-Proteine gehören zur Helikase-Superfamilie 6 (Singleton *et al.*, 2007) und besitzen eine 3'-5'-Helikasepolarität. Sie gehören außerdem zur Familie der AAA⁺-Proteine (*ATPases associated with a variety of cellular activities*) (Iyer *et al.*, 2004; Koonin, 1993). Diese Enzym-Superfamilie beinhaltet nicht nur DNA- und RNA-Helikasen, sondern auch Proteasen, Chaperone, Metall-Chelatasen und weitere Proteine, die an der Replikation beteiligt sind wie z.B. der Initiationsfaktor ORC (Clarey *et al.*, 2006) und Helikase-Ladepoteine wie CDC6 (Liu *et al.*, 2000). MCM-Proteine oligomerisieren wie viele Mitglieder dieser Gruppe in ringförmige (toroidale) Strukturen und verwenden die Hydrolyse von ATP, um ihr Substrat (z.B. DNA) in ihrem zentralen Kanal zu manipulieren (Bochman & Schwacha, 2007; Pape *et al.*, 2003). Die ATPase-Aktivität wird in AAA⁺-Proteinen durch zwei Subdomänen vermittelt (Abb. 1.5). Die erste Subdomäne enthält den P-loop (*phosphate binding loop*). Die zweite, „lid“ (Deckel) genannte Subdomäne liegt C-terminal zur ersten Subdomäne. Beide Subdomänen enthalten konservierte Motive: der P-loop enthält das Walker-A-Motiv, welches die Bindung von ATP und die Positionierung von dessen β - und γ -Phosphaten vermittelt, sowie das Walker-B- und Sensor 1-Motiv, welche das nukleophile Wassermolekül und ein Mg^{2+} -Ion für die ATP-Hydrolyse koordinieren. Die lid-Domäne enthält einen „Arginin-Finger“ und das Sensor 2-Motiv, welche den Kontakt mit dem γ -Phosphat des ATPs herstellen. Das aktive Zentrum wird nicht innerhalb einer Untereinheit gebildet, sondern an den Dimer-Schnittstellen: Eine Untereinheit stellt den P-loop zur Verfügung (*cis*), während die zweite Untereinheit den Arginin-Finger sowie das Sensor 2-Motiv bereitstellt (*trans*) (Abb. 1.5) (Bochman & Schwacha, 2009; Erzberger & Berger, 2006; Hanson & Whiteheart, 2005).

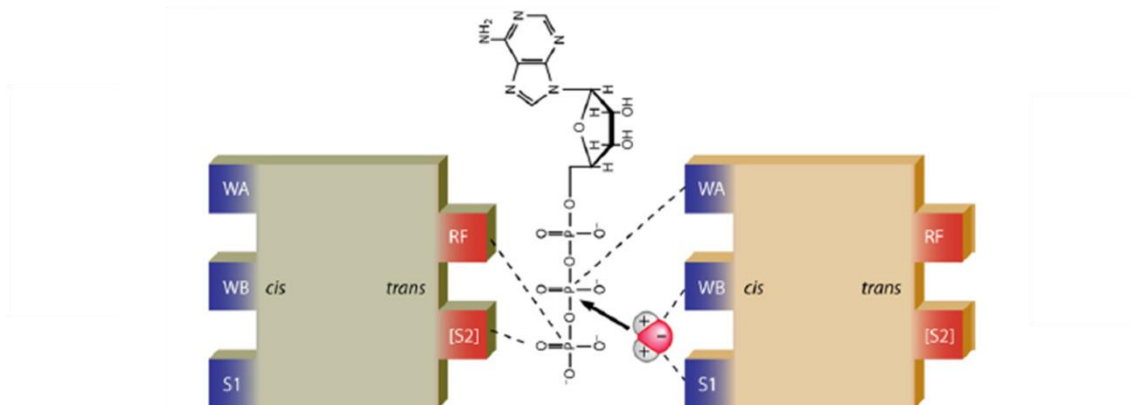


Abb. 1.5 Modell der ATP-Hydrolyse durch AAA⁺-Proteine (Bochman & Schwacha, 2009)

Die Hydrolyse von ATP wird durch die Motive Walker-A (WA), Walker-B (WB) und Sensor 1 (S1) aus einer Untereinheit und dem Arginin-Finger (RF) sowie dem Sensor 2-Motiv (S2) der anderen Untereinheit vermittelt

Zusätzlich zu den kanonischen Motiven der AAA⁺-Proteine besitzen die MCM-Proteine Sequenzinsertionen, die so genannte „β-Haarnadel-Finger“ ausbilden, welche den Kontakt mit der DNA herstellen und wahrscheinlich die ATP-Bindung und -Hydrolyse mit der Entwindung der DNA koppeln (Brewster *et al.*, 2010; Fletcher *et al.*, 2003; Gai *et al.*, 2004). Zusätzlich enthalten die MCM-Proteine noch ein „Zink-Finger“-Motiv nahe des N-Terminus, welches nicht direkt in die DNA-Bindung involviert ist, jedoch stabilisierend für die Faltung der N-terminalen Domäne wirkt (Fletcher *et al.*, 2003; Fletcher *et al.*, 2005; Yan *et al.*, 1991).

MCM-Gene werden in Eukaryoten und Archaea gefunden, wohingegen sie in allen sequenzierten Bakterien fehlen. Bei den Bakterien ist die replikative Helikase das DnaB-Protein, welches ebenfalls einen hexameren Ring bildet, aber die entgegengesetzte Translokationspolarität (5'-3') besitzt (Kaplan, 2000; LeBowitz & McMacken, 1986). DnaB umschließt die einzelsträngige DNA am Folgestrang (Atkinson *et al.*, 2011; LeBowitz & McMacken, 1986). Durch die Translokation am Folgestrang wird der DNA-Doppelstrang durch sterische Verdrängung (*steric exclusion*) des Leitstranges entwunden (Gupta *et al.*, 2010; Kaplan, 2000). Auch für die MCM-Proteine der Eukaryoten konnte gezeigt werden, dass sie die DNA durch *steric exclusion* entwinden (Kanter *et al.*, 2008; Kaplan *et al.*, 2003). Die unterschiedliche Translokationspolarität der Helikasen von Bakterien und Eukaryoten bzw. Archaea lässt vermuten, dass es sich bei deren Evolution um eine konvergente Entwicklung handelt.

Die MCM-Proteine der Archaea werden in Kap. 1.4.3 näher beschrieben, auf die Proteine MCM2-7 der Eukaryoten wird in Kap. 1.4.4 näher eingegangen. MCM8 ist Gegenstand der vorliegenden Arbeit, eine nähere Beschreibung des Proteins ist in Kap. 1.4.5 gegeben.

In Eukaryoten wurden noch andere MCM-Proteine identifiziert. MCM9 aus *Xenopus* wird eine essentielle Rolle von in der Formierung des pre-RC zugeschrieben (siehe auch Kap. 1.2.1) (Lutzmann & Mechali, 2008). Darüber hinaus wurden einige zusätzliche Gene identifiziert, die *mcm* genannt werden. Dazu zählen der Transkriptionsfaktor MCM1 (Treisman & Ammerer, 1992), der essentielle DNA-Replikationsfaktor MCM10 (siehe auch Kap. 1.2.1 und 1.2.2) (Homesley *et al.*, 2000; Ricke & Bielinsky, 2004; Warren *et al.*, 2009; Wohlschlegel *et al.*, 2002), sowie MCM17 (Roy *et al.*, 1997), MCM21 und MCM22 (Poddar *et al.*, 1999), welche in der Chromosomenaufteilung eine Rolle spielen. Da diese jedoch keine Homologie zu MCM2-7 aufweisen, werden sie im Folgenden nicht näher beschrieben.

1.3.3. MCMs der Archaea

Da die Erforschung des eukaryotischen heterohexameren MCM2-7-Komplexes vergleichsweise kompliziert ist, wurden die bisher detailliertesten Ergebnisse der MCM-Proteinbiochemie in den Untersuchungen der homohexameren archaealen MCM-Komplexe aus *Methanothermobacter thermoautotrophicus* (*MthMCM*) und *Sulfolobus solfataricus* (*SsoMCM*) gewonnen. Da die Entwindung der DNA eine Reihe einfacherer biochemischer Vorgänge wie Oligomerisation, ATP-Bindung und -Hydrolyse, DNA-Bindung und Translokation voraussetzt, liefern Studien der archaealen MCM-

Proteine, welche sich auf diese Vorgänge fokussieren, wichtige mechanistische Details und dienen als ein Leitfaden für die aktuellen Studien an den eukaryotischen MCM-Proteinen.

MthMCM und *SsoMCM* bilden homohexamere Strukturen aus, wobei *SsoMCM* für gewöhnlich als Einzelhexamer auftritt (Carpentieri *et al.*, 2002; Pucci *et al.*, 2004), *MthMCM* hingegen bildet in Lösung bevorzugt Doppelhexamere aus (Fletcher *et al.*, 2003; Kelman *et al.*, 1999). Die Formation des Doppelhexamers wird durch ein N-terminales „Zink-Finger“-Motiv vermittelt (Fletcher *et al.*, 2003; Fletcher *et al.*, 2005; Kasiviswanathan *et al.*, 2004). Die Oligomerisation der archaealen MCM-Proteine ist unabhängig von ATP (Kelman *et al.*, 1999), jedoch vermittelt durch Kontakte über die gesamte Länge des Proteins (Brewster *et al.*, 2008; Fletcher *et al.*, 2003). Hierbei sind die Kontakte zwischen den N-terminalen Domänen stärker, da diese ohne die C-terminale Domäne in Lösung Einzel- und Doppelhexamere ausbilden können (Fletcher *et al.*, 2003; Liu *et al.*, 2008). Die Kristallstrukturen von *MthMCM* und *SsoMCM* konnten bereits im Detail aufgeklärt werden und liefern so genaue Informationen über die Lage der einzelnen Domänen (Brewster *et al.*, 2008; Fletcher *et al.*, 2003; Liu *et al.*, 2008; Pape *et al.*, 2003). Exemplarisch sind in Abb. 1.6 die Strukturen des Monomers sowie des Hexamers von *SsoMCM* gezeigt (Brewster *et al.*, 2008).

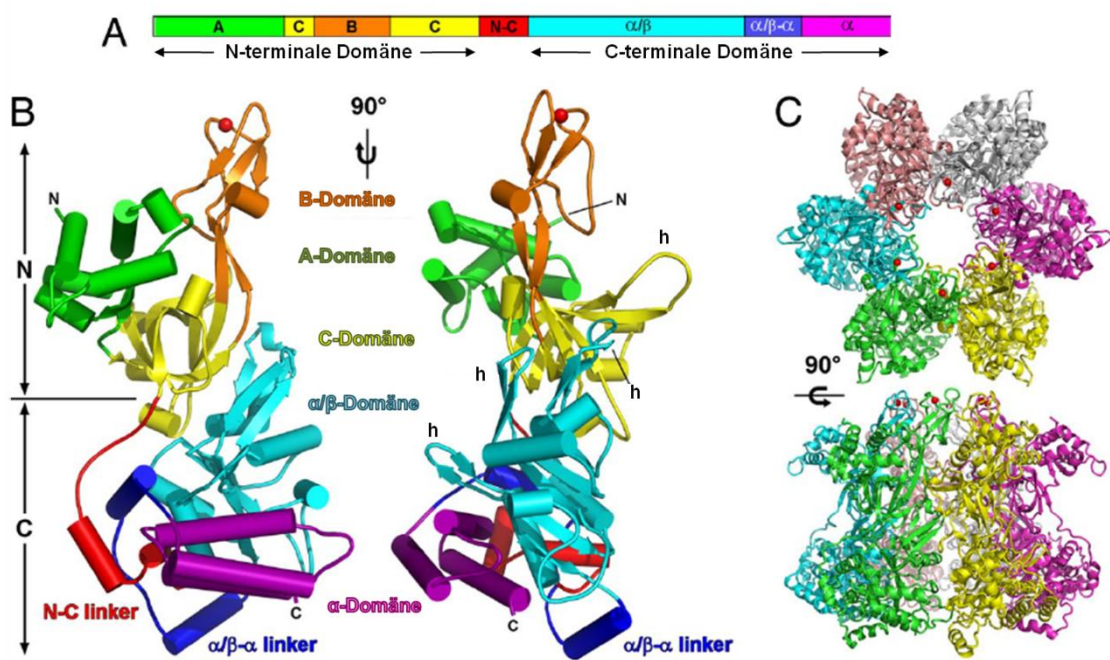


Abb. 1.6 Strukturmodelle des Monomers und des Hexamers von *SsoMCM* (Brewster *et al.*, 2008)

A: Domänenmodell von *SsoMCM*.

B: „ribbon“-Darstellung von zwei Seitenansichten eines Monomers von *SsoMCM*. N – N-terminale Domäne; C – C-terminale Domäne; h – β -Haarnadel-Finger

C: „ribbon“-Darstellung der Aufsicht sowie der Seitenansicht des *SsoMCM*-Hexamers. Zink-Atome sind durch rote Punkte dargestellt

Die N- und C-terminale Domänen der archaealen MCM-Proteine sind durch einen langen strukturierten Linker verbunden, der sich auf der Außenseite des Hexamers befindet (Abb. 1.6) (Brewster *et al.*, 2008; Pape *et al.*, 2003). Die N-terminale Domäne enthält das Zink-Finger-Motiv sowie den N-terminalen β -Haarnadel-Finger, welcher den Kontakt zur DNA herstellt (Abb. 1.6) (Fletcher *et al.*, 2003; Pucci *et al.*, 2007). Die C-terminale Domäne enthält alle ATPase-Motive der

AAA⁺-Proteine (siehe auch 1.4.3) (Iyer *et al.*, 2004) und drei β -Haarnadel-Finger (Abb. 1.6) (Brewster *et al.*, 2008). Die ATPase-Motive Walker-A, Walker-B und Sensor 1 sind auf Schleifen lokalisiert, die in Richtung der einen Dimer-Schnittstelle orientiert sind (*cis*), während der Arginin-Finger und das Sensor 2-Motiv sich in Richtung der anderen Dimer-Schnittstelle orientieren (*trans*) (Moreau *et al.*, 2007).

Für die Proteine *MthMCM* und *SsoMCM* konnte gezeigt werden, dass sie prozessive DNA-Helikasen sind, welche 3'-5'-Polarität besitzen und deren Aktivität von ATP und Mg²⁺-Ionen abhängig ist (Barry *et al.*, 2007; Carpentieri *et al.*, 2002; Chong *et al.*, 2000; Jenkinson & Chong, 2006). *MthMCM* und *SsoMCM* hydrolysieren ATP (Barry *et al.*, 2007; Fletcher & Chen, 2006; McGeoch *et al.*, 2005), jedoch bevorzugen sie verschiedene DNA-Substrate. So wird die ATP-Hydrolyse bei *MthMCM* durch ss- und dsDNA (Chong *et al.*, 2000; Kasiviswanathan *et al.*, 2004), bei *SsoMCM* nur durch ssDNA stimuliert (Brewster *et al.*, 2008; McGeoch *et al.*, 2005).

1.3.4. MCM2-7

MCM2-7 bildet zusammen mit CDC45 und GINS als CMG-Komplex die aktive Helikase der eukaryotischen DNA-Replikation (siehe auch 1.2.2 und 1.3) (Aparicio *et al.*, 2009; Bauerschmidt *et al.*, 2007; Costa *et al.*, 2011; Ilves *et al.*, 2010; Moyer *et al.*, 2006). Anders als die homohexameren Helikasen der Archaea ist der MCM2-7-Komplex ein Hexamer aus sechs verschiedenen, essentiellen Untereinheiten, die jedoch vor allem in der zentralen MCM-Region große Homologie aufweisen. Abb. 1.7 zeigt die relative Lage der MCM-Domänen sowie der Motive Walker A und Walker B in den MCM2-7-Proteinen.

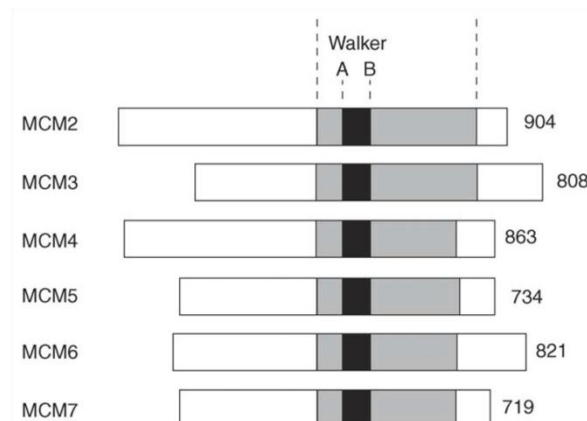


Abb. 1.7 Vereinfachtes Alignment der humanen MCM2-7 Proteine (Maiorano *et al.*, 2006)

Die Balken repräsentieren die angegebenen Proteine. Die Domäne der MCM2-7-Proteinfamilie ist in grau, die Walker-A- und Walker-B-Motiv umfassende Domäne in schwarz dargestellt. Die Zahlen geben die Anzahl der Aminosäuren an.

Die ersten Fraktionierungsexperimente der eukaryotischen MCM-Proteine aus Zellextrakten zeigten verschiedene dimere, trimere und tetramere Komplexe sowie einen alle sechs Untereinheiten enthaltenden Komplex (Davey *et al.*, 2003; Ishimi, 1997; Lee & Hurwitz, 2000). MCM2-7 repräsentiert einen heterohexameren Komplex von ca. 600 kDa, welcher die MCM-Untereinheiten in einer

1:1:1:1:1.1 Stöchiometrie enthält und unabhängig von der Anwesenheit von ATP seine hexamere Struktur beibehält (Adachi *et al.*, 1997; Davey *et al.*, 2003; Lee & Hurwitz, 2000). Des Weiteren bildet MCM2-7 ähnlich den archaealen Helikasen einen ringförmigen Komplex (siehe auch 1.3.3) (Adachi *et al.*, 1997; Bochman & Schwacha, 2007). Die Helikaseaktivität von MCM2-7 konnte *in vitro* nachgewiesen werden (Bochman & Schwacha, 2008). Außer dem MCM2-7-Komplex wurde ein weiterer Komplex isoliert, welcher aus je zwei Untereinheiten MCM4, MCM6 und MCM7 besteht und so ein Hexamer aus zwei Heterotrimeren bildet. Dieser Komplex besitzt ebenfalls eine ATP-abhängige 3'-5'-Helikaseaktivität (Ishimi, 1997; Kaplan *et al.*, 2003; You *et al.*, 2002). Die Helikaseaktivität dieses Komplexes benötigt nur die aktiven Zentren von MCM4 und MCM7, da beide sogar in Abwesenheit von MCM6 hexamerisieren können und immer noch Helikaseaktivität besitzen (Kanter *et al.*, 2008). Wird zum MCM4/6/7-Komplex MCM2 oder ein Dimer aus MCM3 und MCM5 zugegeben, wird die Helikaseaktivität inhibiert (Sato *et al.*, 2000). Dies lässt darauf schließen, dass den Proteinen des MCM2-7-Komplexes verschiedene Funktionen zuzuordnen sind, wobei MCM4, MCM6 und MCM7 für die Helikaseaktivität benötigt werden und MCM2, MCM3 und MCM5 vermutlich als negative Regulatoren dienen (Schwacha & Bell, 2001). Kürzlich konnte die Struktur des MCM2-7-Komplexes aufgeklärt werden (Costa *et al.*, 2011). Die Struktur des Komplexes ist dynamisch und alterniert zwischen einer planaren und einer spiralig offenen Konformation (Abb. 1.8). Nachdem MCM2-7 an die dsDNA gebunden hat, kann durch diese dynamische Struktur die nach der initialen Entwindung des DNA-Doppelstranges entstandene ssDNA durch die Öffnung des Rings zwischen MCM2 und MCM5 in den zentralen Kanal aufgenommen werden (Costa *et al.*, 2011). Wie *MthMCM* wird auch MCM2-7 als Doppelhexamer zur origin-DNA rekrutiert (Evrin *et al.*, 2009; Gambus *et al.*, 2011; Remus *et al.*, 2009).

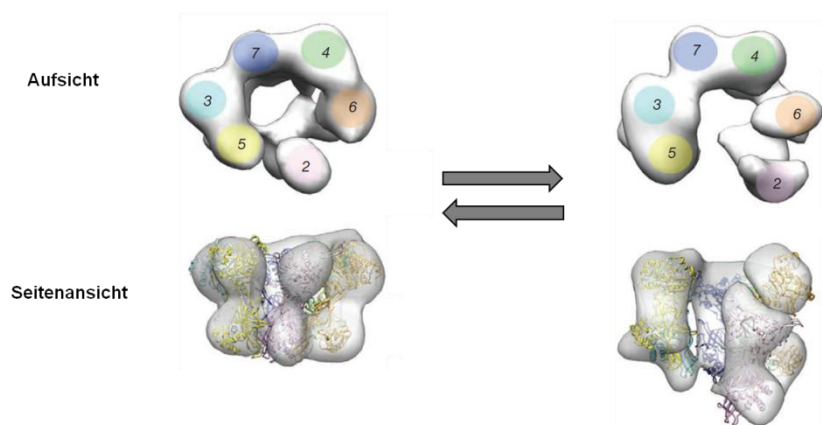


Abb. 1.8 Strukturmodelle des *S. cerevisiae* MCM2-7-Komplexes (Grafik abgewandelt nach Costa *et al.*, 2011)
Die Struktur des Komplexes ist dynamisch und alterniert zwischen einer planaren (rechts) und einer spiralig-offenen Konformation (links). Die Zahlen bezeichnen die MCM-Untereinheiten.

Für MCM2-7 aus *S. cerevisiae* wurde eine schwache ATPase-Aktivität nachgewiesen (Lee & Hurwitz, 2000), welche jedoch untypisch für eine Helikase weder durch ssDNA noch durch dsDNA stimulierbar war (Bochman & Schwacha, 2008; Davey *et al.*, 2003; Schwacha & Bell, 2001). Für den MCM4/6/7-Subkomplex konnte eine Stimulation durch ssDNA sowie durch dsDNA nachgewiesen werden (Ishimi, 1997; Lee & Hurwitz, 2001; You *et al.*, 2003).

Die Proteine MCM2-7 besitzen alle konservierten ATPase-Motive der AAA⁺-Proteine, bei denen die Motive Walker A und Walker B von einer Untereinheit (*cis*), der Arginin-Finger von einer anderen (*trans*) bereitgestellt wird (siehe auch 1.4.2) (Bochman & Schwacha, 2008; Davey *et al.*, 2003). Die gleichen Sequenzmotive finden sich im Protein MCM8, welches im Folgenden vorgestellt wird.

1.3.5. MCM8

Bei der Untersuchung der Integrationsstellen des humanen Hepatitis B Virus bei Patienten mit Leberkrebs wurde das MCM8-Gen zum ersten Mal identifiziert (Gozuacik *et al.*, 2003). Das davon abgeleitete Protein besteht aus 840 Aminosäuren, hat eine molekulare Masse von 94 kDa und läuft im SDS-Gel auf einer Höhe von ca. 95-100 kDa (Gozuacik *et al.*, 2003; Johnson *et al.*, 2003). Außer in Hefen und in *Caenorhabditis elegans* ist das MCM8-Protein in allen Eukaryoten konserviert (Gozuacik *et al.*, 2003). Die Ähnlichkeit sowie die Identität zwischen MCM8 und den anderen humanen MCM-Proteinen sowie den MCM-Proteinen aus den Archaeen *Methanothermobacter thermoautotrophicus* (*mthMCM*) und *Sulfolobus solfataricus* (*SsoMCM*) sind in Tab. 1.1 zusammengefasst (Berechnet durch UniProt-Alignment, Alignment siehe Anhang).

Protein	MCM2	MCM3	MCM4	MCM5	MCM6	MCM7	<i>Mth</i> MCM	<i>Sso</i> MCM
Ähnlichkeit mit MCM8	35%	35%	36%	33%	37%	32%	31%	32%
Identität mit MCM8	25%	24%	26%	24%	22%	23%	26%	27%
Identität mit MCM8 in Walker A+B-Motiven	47%	47%	51%	48%	48%	52%	57%	57%

Tab. 1.1 Sequenzähnlichkeit sowie Sequenzidentität zwischen MCM8 und anderen MCM-Proteinen (Berechnet durch UniProt Alignment, Alignment siehe Anhang)

MCM8 besitzt die für Helikasen typischen kanonischen Walker A- und Walker-B-Motive und weist in diesem Bereich große Identität mit den MCM2-7 - Proteinen auf (Tab 1.1) (Johnson *et al.*, 2003). Die größte Homologie zwischen MCM8 und den anderen MCM-Proteinen wurde in der zentralen Region von 210 Aminosäuren (Reste 400 ± 609) gefunden, welche bei allen humanen MCM-Proteinen das Walker-A-Motiv 'GxxGxGKS' und die MCM-Signatursequenz IDEFDKM enthält (Abb. 1.9) (Gozuacik *et al.*, 2003; Johnson *et al.*, 2003). Dabei ähnelt die Walker-A-Konsensus-Sequenz von MCM8 eher derjenigen von *MthMCM* (Kearsey & Labib, 1998) und damit der einer ursprünglichen Helikase. Bei den MCM2-7-Proteinen hingegen ist der dritte Glycinrest durch Alanin (MCM 2,3,5,6 und 7) oder Serin (MCM4) ersetzt. Vor allem im Bereich der Walker-A- und Walker-B-Motive sind die Sequenzidentitäten von MCM8 und *MthMCM* bzw. *SsoMCM* größer als die Identität mit manchen humanen MCM-Proteinen (Tab. 1.1). MCM8 besitzt wie alle AAA⁺-ATPasen den zur ATP-Hydrolyse benötigten

Arginin-Finger (Ogura *et al.*, 2004) und wie MCM2, 4, 6 und 7 ein N-terminales Zink-Finger-Motiv (Gozuacik *et al.*, 2003). Eine Übersicht über die Domänenstruktur von MCM8 ist in Abb. 1.9 gegeben.

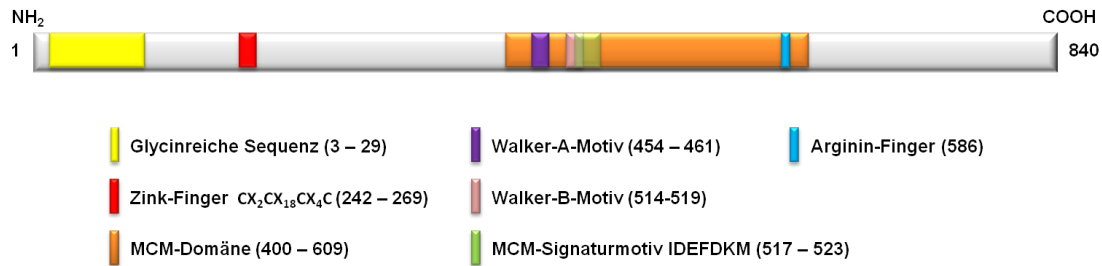


Abb. 1.9 Domänenmodell des humanen MCM8-Proteins, zusammengestellt aus Literaturdaten (Gozuacik *et al.*, 2003) und Sequenzanalyse

MCM8 ist ebenso wie die anderen MCM-Proteine im Zellkern lokalisiert, enthält jedoch kein nukleäres Lokalisationssignal (NLS). Dies lässt darauf schließen, dass es durch die Bindung an ein nukleäres Protein in den Zellkern transportiert wird (Gozuacik *et al.*, 2003; Kinoshita *et al.*, 2008).

Die höchste Expression von MCM8 wird in der Placenta, der Lunge und der Pankreas detektiert. Weiterhin wird MCM8 im Herzen, der Leber, im Skelettmuskel und im Gehirn sowie in allen darauf untersuchten Tumorgeweben exprimiert (Gozuacik *et al.*, 2003; Johnson *et al.*, 2003). Die Expression von MCM8 ist zellzyklusabhängig reguliert, mit geringer Expression in der G1-Phase, einem Anstieg in der späten G1-Phase und einer Stabilisierung während der S- sowie der G2/M-Phase (Gozuacik *et al.*, 2003).

Die Funktion und die Rolle des humanen MCM8-Proteins im Zellzyklus wird kontrovers diskutiert und wurde bisher überwiegend *in vivo* erforscht. Möglicherweise ist MCM8 in Replikations-Vorgänge während der Synthese-Phase involviert, denn es wurde gezeigt, dass MCM8 in der späten Synthese-Phase und am G2/M-Phase-Übergang am Chromatin assoziiert ist (Gozuacik *et al.*, 2003). Ebenfalls Hinweise auf eine Beteiligung von MCM8 in der Elongationsphase der Replikation wurden so für das homologe Protein aus *Xenopus laevis* (XMCM8) gefunden (Maiorano *et al.*, 2005). Für eine Funktion in der initialen Entwindung der DNA vor der Replikation sprechen jedoch Untersuchungen, in denen humanes MCM8 zu Beginn der Synthese-Phase chromatingebunden vorlag (Volkening & Hoffmann, 2005).

Eine Interaktion bzw. Kolo-kalisation von MCM8 konnte mit den pre-RC-Komponenten CDC6 und Orc2 (Volkening & Hoffmann, 2005), den Helikasekomponenten MCM4, MCM6, MCM7 (Johnson *et al.*, 2003) sowie mit dem Replikationsfaktor RPA70 in HeLa-Zellen gezeigt werden (Kinoshita *et al.*, 2008). Außerdem wurde gezeigt, daß für eine Rekrutierung von XMCM8 zum Chromatin die Chromatinbindung von MCM2-7 sowie die Aktivität der S-CDK benötigt werden (Maiorano *et al.*, 2005).

Eine Depletion von MCM8 bewirkt eine reduzierte Rekrutierung von CDC6, RPA und der DNA-Polymerase α zum Chromatin und damit eine Verlangsamung der DNA-Synthese (Maiorano *et al.*, 2005; Volkening & Hoffmann, 2005). Des Weiteren wurde für REC, das orthologe Protein zu MCM8 aus *Drosophila melanogaster* gezeigt, dass eine Depletion von REC zu einer verminderten Assoziation von PCNA ans Chromatin und einer verminderten Ausbildung von Replikationsgabeln

führt (Crevel *et al.*, 2007). Außerdem konnte hier gezeigt werden, dass REC essentiell für die Rekombination in *Drosophila* ist, da es die Ausbildung von meiotischen Crossovers vorantreibt (Blanton *et al.*, 2005; Matsubayashi & Yamamoto, 2003).

Xenopus MCM8 ist das einzige MCM8-Protein, welches bereits *in vitro* untersucht wurde (Maiorano *et al.*, 2005). Hier wurden für das rekombinante Protein eine DNA-abhängige ATPase-Aktivität und eine Helikase-Aktivität nachgewiesen. Die Aktivität war unabhängig von einer Stimulation durch den MCM2-7-Komplex, was darauf schließen lässt, dass MCM8 als Helikase an der DNA-Replikation beteiligt ist (Maiorano *et al.*, 2005). Die *in vivo* gezeigte Assoziation von MCM8 mit MCM4, MCM6 und MCM7 (Johnson *et al.*, 2003; Kinoshita *et al.*, 2008) konnte *in vitro* allerdings nicht bestätigt werden (Maiorano *et al.*, 2005).

Die humanen MCM-Proteine wurden als neue Biomarker zur Detektion von G1-Phase-Zellen ‚mit Wachstumspotenzial‘ vorgeschlagen. Aufgrund ihrer Eigenschaften können die MCM-Proteine möglicherweise als Tumor-Marker für die Krebsforschung dienen (Freeman *et al.*, 1999; Todorov *et al.*, 1998). Im Falle von MCM8 wird diese These durch Ergebnisse gestützt, wo MCM8 im Vergleich mit normalem Lebergewebe in einer höher proliferativen Lebertumorzelllinie (Huk7) akkumuliert oder in einer mutierten Form vorliegt (Gozuacik *et al.*, 2003; Johnson *et al.*, 2003). Außerdem ist die Expression der MCM2-8 Proteine in Neuroblastom-Zellen erhöht (Koppen *et al.*, 2007).

Da vermutet wird, dass MCM8 als Helikase in die DNA-Replikation involviert ist, werden im Folgenden die essentiellen Helikase-Cofaktoren CDC45 und GINS genauer beschrieben.

1.4. CDC45 und GINS

Das CDC45-Gen (*cell division cycle protein 45*; siehe auch 1.2.2) wurde erstmals in *Saccharomyces cerevisiae* nachgewiesen (Moir *et al.*, 1982), und kodiert ein aus 650 AS bestehendes Protein (Hopwood & Dalton, 1996). Homologe dieses Proteins wurden später auch in anderen Eukaryoten identifiziert. Das humane CDC45 wurde bei der Untersuchung der *DiGeorge critical region* (DGCR) identifiziert, welche bei einer Entwicklungsstörung in der Embryogenese eine Rolle spielt (McKie *et al.*, 1998; Saha *et al.*, 1998b). Das humane CDC45-Protein besteht aus 566 AS und besitzt ein Molekulargewicht von 60 kDa. Die Rolle von CDC45 im Zellzyklus wurde bisher am besten in Hefen und *Xenopus* untersucht. CDC45 assoziiert mit dem pre-RC nach Aktivierung der S-CDK (Zou & Stillman, 1998). Hier ist CDC45 durch Interaktion mit Orc2 (Saha *et al.*, 1998b), Sld3 (Kamimura *et al.*, 2001), Mcm10 (Christensen & Tye, 2003), Mcm2-7 (Kukimoto *et al.*, 1999; Zou & Stillman, 1998; Zou & Stillman, 2000) und dem GINS-Komplex (Bauerschmidt *et al.*, 2007) sowie der Rekrutierung von RPA und der DNA-Polymerasen maßgeblich an der Umwandlung des pre-RC in den IC, der Entwindung der doppelsträngigen DNA sowie der Ausbildung und Progression der Replikationsgabel beteiligt (Aparicio *et al.*, 2009; Mimura *et al.*, 2000; Pacek & Walter, 2004; Walter & Newport, 2000; Zou & Stillman, 2000).

Von besonderer Bedeutung für die DNA-Replikation ist die Interaktion von CDC45 mit dem MCM2-7-Komplex (siehe auch 1.3.4) und GINS, da diese während der S-Phase den stabilen Komplex der replikativen Helikase am Chromatin bilden. Dieser Komplex wandert mit der Replikationsgabel und entwindet den DNA-Doppelstrang (Aparicio *et al.*, 2009; Gambus *et al.*, 2006; Ilves *et al.*, 2010; Pacek *et al.*, 2006). CDC45 und GINS werden in diesem Kontext als mögliche Helikase-Cofaktoren für die Replikation diskutiert, welche die Helikase MCM2-7 aktivieren und die geschlossene Konformation des hexameren Ringes stabilisieren (Abb. 1.10)(Costa *et al.*, 2011; Masuda *et al.*, 2003; Pacek & Walter, 2004). GINS steht für *Go Ichi Nii San* (japanisch für 5-1-2-3) und ist ein heterotetramerer Komplex aus den Proteinen Sld5, Psf1, Psf2 und Psf3 (Kubota *et al.*, 2003; Takayama *et al.*, 2003). Die Interaktion von CDC45 mit dem MCM2-7-Komplex sowie den DNA-Polymerasen wird dahingehend interpretiert, dass CDC45 die Helikase- mit der Polymeraseaktivität koordiniert (Bauerschmidt *et al.*, 2007; Tercero *et al.*, 2000). Möglicherweise bleibt die MCM2-7-Helikase solange inaktiv, bis die durch CDC45 unterstützten replikativen DNA-Polymerasen gebunden haben. Da seine Funktion als Helikase-Cofaktor erfüllt ist, dissoziiert CDC45 in der Mitose-Phase vom Chromatin (Zou & Stillman, 1998).

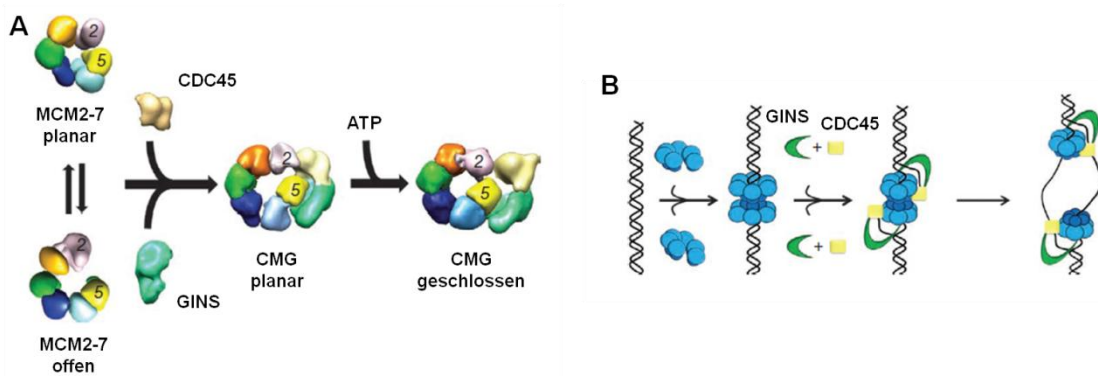


Abb. 1.10 Modell der Struktur und Funktion des *Drosophila* CMG-Komplexes (Grafik abgewandelt nach Costa *et al.*, 2011)

A: Der MCM2-7-Komplex existiert entweder in einer offenen oder planaren Konfiguration (siehe auch Abb. 1.8). Die Bindung von CDC45 und GINS stabilisiert die planare Form, während die Bindung von ATP den Ringschluss bewirkt.

B: Der offene MCM2-7-Komplex wird als inaktives Doppelhexamer zum Chromatin rekrutiert. CDC45 und GINS binden an MCM2-7, begleitet durch eine Isomerisierung, welche die aufgeschmolzene DNA stabilisiert.

1.5. Problemstellung

Die enzymatische Aktivität von MCM8 sowie seine Funktion im Zellzyklus sind noch wenig erforscht. Es wurden bisher nur wenige Prozesse identifiziert, in denen MCM8 eine Rolle spielt, ebenso ist noch wenig über die Interaktionspartner von MCM8 bekannt. Humanes MCM8 wurde bisher zwar in *E. coli* exprimiert (Gozuacik *et al.*, 2005), wurde jedoch noch nie in rekombinanter Form aufgereinigt, sondern überwiegend *in vivo* untersucht. Rekombinantes MCM8 *in vitro* wurde bisher nur aus *Xenopus* untersucht (Maiorano *et al.*, 2005). Hier konnte eine DNA-abhängige ATPase-Aktivität so wie eine Helikaseaktivität nachgewiesen werden.

In dieser Arbeit sollte zunächst unter der Verwendung von *Escherichia coli*, *Saccharomyces cerevisiae* sowie Sf9- und High Five-Insektenzellen eine Methode zur Expression von löslichem rekombinantem humanen MCM8 etabliert werden. Lösliches Protein sollte aufgereinigt und auf seine Funktionalität im Hinblick auf eine DNA-abhängige ATPase-Aktivität untersucht werden. Des Weiteren sollte durch Co-Aufreinigungs- und Co-Immunopräzipitationsexperimente sowie analytischer Gelfiltration eine mögliche Interaktion von MCM8 mit dem essentiellen Helikase-Cofaktor CDC45 untersucht werden. Zusätzlich sollten Untersuchungen in HeLa-Zellen weitere Hinweise auf eine Interaktion der beiden Proteine liefern.

2. Materialien und Methoden

2.1. Materialien

2.1.1. Bakterienstämme

Stamm	Eigenschaften	Bezugsquelle
<i>E.coli</i> DH5α	<i>recA1, endA1, gyrA96, thi, hsdR17(rk⁻, mk⁺); relA1, supE44, Φ80ΔlacZΔM15, Δ(lacZYA-argF)U169</i>	Invitrogen, Carlsbad, California, USA
<i>E.coli</i> XI1Blue	<i>(recA1 endA1 gyrA96 thi-1 hsdR17 supE44 relA1 lac [F' proAB lacIqZ.M15 Tn10 (Tet^r)])</i>	Stratagene, La Jolla CA (USA)
<i>E.coli</i> BL21 (DE3) CodonPlus – RIL-Stamm	<i>F' ompT hsdS(r_B⁻ m_B⁻) dcm⁻Tet^r gal λ (DE3) endA Hte [argU ileY leuW Cam^r]</i>	Stratagene, La Jolla CA (USA)
<i>E.coli</i> Origami (DE3)	<i>Δ(ara-leu)7697 ΔlacX74 ΔphoA Pvull phoR araD139 ahpC galE galK rpsL (DE3) F'[lac⁺ lacI^f pro] gor522::Tn10 trxB (Kan^R, Str^R, Tet^R)</i>	Novagen, Darmstadt
<i>E.coli</i> Rosetta-gami (DE3)	<i>Δ(ara-leu)7697 ΔlacX74 ΔphoA Pvull phoR araD139 ahpC galE galK rpsL (DE3) F'[lac⁺ lacI^f pro] gor522::Tn10 trxB pRARE (Cam^R, Kan^R, Str^R, Tet^R)</i>	Novagen, Darmstadt
<i>E.coli</i> Rosetta™ 2 (DE3) pLysS	<i>F' ompT hsdS_B(r_B⁻ m_B⁻) gal dcm (DE3) pLysSRARE2 (Cam^R)</i>	Novagen, Darmstadt

2.1.2. Hefezellstämme

Stamm	Eigenschaften	Bezugsquelle
<i>S. cerevisiae</i> BJ1991	<i>MATα, leu2, trp1, ura3-52, prb 1-1122, pep4-3, GAL⁺</i>	G.Lipps
<i>S. cerevisiae</i> HT393	<i>MATα, leu2-3, leu2-112, ura3Δ5, prb1-1, prc1-1, pra1-1, pre1-1</i>	G.Lipps
<i>S. cerevisiae</i> 150-2B	<i>MATα, ura3-52 his3-Δ1 leu2-3,112 trp1-289</i>	G.Lipps

2.1.3. Insektenzelllinien

Stamm	Eigenschaften	Bezugsquelle
Sf9	Immortalisierte Zelllinie aus dem Ovargewebe von <i>Spodoptera frugiperda</i> , Verwendet zur transienten Expression rekombinanter Proteine in Monolayer- und Suspensionskultur sowie zur Amplifikation von Baculoviren	Novagen, Darmstadt
<i>Trichoplusia ni</i> BTI-TN5B1-4 (<i>High Five</i>)	Immortalisierte Zelllinie aus dem Ovargewebe von <i>Trichoplusia ni</i> , Verwendung zur Expression rekombinanter Proteine in Monolayerkultur durch Baculoviren	ATCC

2.1.4. Humane Zelllinien

Stamm	Eigenschaften	Bezugsquelle
HeLa	Adhärenzte humane Cervixkarzinoma Zelllinie (ATCC:CCL-2)	ATCC

2.1.5. Verwendete und konstruierte Plasmide

Plasmid	Verwendungszweck	Quelle
pET28c	Klonierungsvektor für Proteinexpression in <i>E. coli</i>	Novagen, Darmstadt
pKJE7	Expression der Chaperone dnaK-dnaJ-grpE	Takara Bio Inc., St Germain en Laye, Frankreich
pGKJE8	Expression der Chaperone dnaK-dnaJ-grpE und groES-groEL	
pGro7	Expression der Chaperone groES-groEL	
pTF16	Expression des <i>E. coli</i> Triggerfaktors	
pG-Tf2	Expression der Chaperone groES-groEL und des <i>E. coli</i> Triggerfaktors	
pGEM-T-MCM8	Umklonierung von MCM8	G. Lipps
pET_H6_MCM8	Expression MCM8 mit N-terminalem His-Tag in <i>E. coli</i>	Diese Arbeit
pET_H6_MCM8 K460E	Expression MCM8 mit N-terminalem His-Tag und Walker-A-Motiv-defekt in <i>E. coli</i>	Diese Arbeit
pET_H6_MCM8_H6	Expression MCM8 mit N- und C-terminalem His-Tag in <i>E. coli</i>	Diese Arbeit

pET_MCM8_H6	Expression MCM8 mit C-terminalem His-Tag in <i>E. coli</i>	Diese Arbeit
pET_MCM8_H6 K460E	Expression MCM8 mit C-terminalem His-Tag und <i>Walker-A</i> -Motiv-defekt in <i>E. coli</i>	Diese Arbeit
pEMBLyex2	Klonierungsvektor für Proteinexpression in Hefe	G. Lipps
pEMBLyex2_H6_MCM8	Expression MCM8 mit N-terminalem His-Tag in <i>E. coli</i> in Hefe	Diese Arbeit
pIEx-1	Klonierungsvektor für transiente Proteinexpression in Insektenzellen	Novagen, Darmstadt
pIEx_H10_MCM8	Transiente Expression MCM8 mit N-terminalem His-Tag in Insektenzellen	Diese Arbeit
pIEx_H10_MCM8 K469E	Transiente Expression MCM8 mit N-terminalem His-Tag und <i>Walker-A</i> -Motiv-defekt in Insektenzellen	Diese Arbeit
pIEx_H10_eGFP	Transiente Expression eGFP mit N-terminalem His-Tag in Insektenzellen	Diese Arbeit
pIEx/Bac-1	Klonierungsvektor für Generierung rekombinanter Baculoviren oder transiente Proteinexpression in Insektenzellen	Novagen, Darmstadt
pIEx/Bac_Strep_MCM8_H10	Generierung rekombinanter Baculoviren für die Expression von MCM8 mit N-terminalem Strep-Tag und C-terminalem His-Tag in Insektenzellen	Diese Arbeit
pIEx/Bac_Strep_MCM8	Generierung rekombinanter Baculoviren für die Expression von MCM8 mit N-terminalem Strep-Tag in Insektenzellen	Diese Arbeit
pIEx/Bac_MCM8_H10	Generierung rekombinanter Baculoviren für die Expression von MCM8 mit C-terminalem His-Tag in Insektenzellen	Diese Arbeit
pIEx/Bac_CDC45	Generierung rekombinanter Baculoviren für die Expression von CDC45 in Insektenzellen	Diese Arbeit

2.1.6. Verwendete und generierte Baculoviren

Baculovirus	Verwendungszweck	Quelle
BacMagic-DNA	Nicht-replizierfähige Baculovirus-DNA zur Generierung rekombinanter Baculoviren	Novagen, Darmstadt
(Strep_MCM8_H10)	Expression von N-terminal Strep- und C-terminal His-getaggttem MCM8 in <i>HiV</i> Insektenzellen	Diese Arbeit
(Strep_MCM8)	Expression von N-terminal Strep-getaggttem MCM8 in <i>HiV</i> Insektenzellen	Diese Arbeit
(MCM8_H10)	Expression von C-terminal His-getaggttem MCM8 in <i>HiV</i> Insektenzellen	Diese Arbeit
(His_CDC45)	Expression von N-terminal His-getaggttem CDC45 in <i>HiV</i> Insektenzellen	H. Pospiech, FLI Jena
(CDC45)	Expression von CDC45 in <i>HiV</i> Insektenzellen	Diese Arbeit

2.1.7. Oligodesoxynukleotide

Die Oligodesoxynukleotide, soweit nicht anders vermerkt, wurden in entsalzter Qualität von metabion (Martinsried) bezogen und nach Angaben des Herstellers in dest. H₂O gelöst.

Oligonukleotid	Sequenz (5' → 3')	Verwendungszweck
MCM8.for	CCC ATA TGG CCA TGG GAG AGT ATA GAG GCA G	Klonierung pET_H6_MCM8
MCM8.rev	GCG TCG ACT ACT CGA GAG TTT GAA GCT GGT AAA CTT TTG G	
MCM8for_neu	CGG ATC CCA TGA ATG GAG AGT ATA GAG GCA GAG G	Klonierung pIEx_H10_MCM8
MCM8rev_neu	GCG GTC GAC TAT TAC ATA GTTT GAA GCT GGT AAA CTT TTG G	
MCM8 BglII for	CCA TAG ATC TCA TGG GAG AGT ATA GAG GC	Klonierung pIEx/Bac_Strep_MCM8_H10
MCM8 NotI rev	GCT TGC GGC CGC CTC GAG AGT TTG AAG CTG G	
pIEB_SM8 His ab (for)	GCT TCA AAC TCT CGA GTA GGC CGC AGG AGC TCC	Quickchange-PCR zum Einführen eines Stop-Codons zur Generierung von pIEx/Bac_Strep_MCM8
pIEB_SM8 His ab (rev)	GCT TCA AAC TCT CGA GTA GGC CGC AGG AGC TCC	

K460E.for	CAG GCC TAG GAG AAA GTC AAA TGC TGC AGG CAG CG	Quickchange-PCR zur Generierung einer Walker-A- Motiv-Defektmutante
K460E.rev	CGC TGC CTG CAG CAT TTG ACT TTC TCC TAG GCC TG	
R586A.for	GGG GAG TGC GCT ACT ATC CGC ATT TGA TTT GG	Quickchange-PCR zur Generierung einer Argininfinger- Defektmutante
R586A.rev	CCA AAT CAA ATG CGG ATA GTA GCG CAC TCC CC	
MCM_seq	GGA TTC CAC GAA CAA TAG AAT GTG AGC	Sequenzierung MCM8
MCM_seq2	CCT TGG CTT GCA TGG GTT TGG C	Sequenzierung MCM8
MCM8seq3	GCA GTG CCA CAG TAG CTC G	Sequenzierung MCM8
IE1Prom(for)	CGT TCA TGT TGG ATA TTG TTT CAG	Sequenzierung pIEx-1, pIEx/Bac-1
HSV-Tag(rev)	CCT CGG GGT CTT CCG GGG	Sequenzierung pIEx-1
IE1-Term(rev)	GCA AAA CCC CAC ACC AAC AAC G	Sequenzierung pIEx-1, pIEx/Bac-1
cdc45_1F_PciI New	GTC ACA TGT TCG TGT CCG ATT TCC GCA AAG	Klonierung pIEx/Bac_CDC45
cdc45_endR_XhoI	GAC CTC GAG CTA GGA CAG GAG GGA AAT AAG	

2.1.8. Einzelsträngige DNA für ATPase-Aktivitätstests

DNA	Sequenz	Bezugsquelle
pB-pRN1-ins	ss-Plasmid-DNA	M.Sanchez
pBlue-pRN1	ss-Plasmid-DNA	M.Sanchez
R659A.for	GGA AGA CTA CAT AGA GGG ACA GAA GAA GTT CGC GGA TCC CAT ATA C	G.Lipps
R659A.rev	GTA TAT GGG ATC CGC GAA CTT CTT CTG TCC CTC TAT GTA GTC TTC C	G.Lipps

2.1.9. Chemikalien und Verbrauchsmaterialien

2.1.9.1. Allgemeine Chemikalien

Alle in der Tabelle nicht aufgeführten Chemikalien wurden in der Qualität p.A. von Merck, Darmstadt oder Sigma-Aldrich, München bezogen. Alle Puffer etc. wurden mit Millipore- oder doppelt destilliertem Wasser hergestellt.

Chemikalien	Bezugsquelle
2-Mercaptoethanol	Fluka BioChemika, Neu Ulm
[γ - ³² P]-ATP	Hartmann Analytic, Braunschweig
Acrylamid: Bisacrylamid (19:1), 25 %	Roth, Karlsruhe
Acrylamid: Bisacrylamid (29:1), 40 %	Roth, Karlsruhe
Agar	Roth, Karlsruhe
Agarose (NEEO, GTQ)	Roth, Karlsruhe
20L-Aminosäuren Kit	Fluka BioChemika, Neu Ulm
Ampicillin	Gerbu, Gaiberg
APS (Ammonium-Peroxodisulfat)	Roth, Karlsruhe
ATP	Boehringer, Mannheim
Bicin	Roth, Karlsruhe
Borsäure	Roth, Karlsruhe
Chloramphenicol	Gerbu, Gaiberg
Complete EDTA-free Protease Inhibitor Mix	Roche, Mannheim
Desoxynukleotide	Boehringer, Mannheim
DTT (Dithiothreitol)	Roth, Karlsruhe
EDTA	Roth, Karlsruhe
Essigsäure	Roth, Karlsruhe
Ethidiumbromid	Roth, Karlsruhe
Harnstoff	Roth, Karlsruhe
Hefeextrakt	Gerbu, Gaiberg
IPTG	Gerbu, Gaiberg
Kanamycin	Gerbu, Gaiberg
Phenol (TE-gesättigt)	Roth, Karlsruhe
Phenylmethylsulfonylfluorid (PMSF)	Roth, Karlsruhe
Pepton	Gerbu, Gaiberg
Roti®Nanoquant	Roth, Karlsruhe
<i>SYBR® Safe DNA gel stain</i>	Invitrogen, Carlsbad, California, USA
TEMED (N,N,N',N', Tetramethylethyldiamin)	Roth, Karlsruhe
Tris	Roth, Karlsruhe

Tricin	Roth, Karlsruhe
X-Gluc (20 mg/ml)	Novagen, Darmstadt
YNB (Yeast Nitrogen Base)	Difco, Detroit USA

2.1.9.2. Verbrauchsmaterialien

Material	Bezugsquelle
Chromatographiesäulchen Mobicols	Mo Bi Tec GmbH, Göttingen
Cellophanfolie	Roth, Karlsruhe
DC-Platten Cellulose MN 300 PEI	Machery Nagel GmbH & Co. KG, Düren
Einmalspritzen (2,5/20 ml)	Dispomed, Geinhausen
Einweg-Erlenmeyerkolben NALGENE® 125 ml, PETG steril	NeoLab, Heidelberg
Eppendorfgefäße (1,5/2,0 ml)	Sarstedt, Nürmbrecht
Gamma Bind Plus Sepharose™	GE Healthcare, München
Glaspipetten	Brand, Wertheim
Immobilon-P PVDF-Membrane	Millipore, Schwalbach
Immulon 2HB Elisa 96 well Platten	Thermo, Waltham, USA
Kodak BioMax MR Film	Sigma-Aldrich, München
Kunststoffpetrischalen	Sarstedt, Nürmbrecht
Küvetten (10x4x45 mm)	Sarstedt, Nürmbrecht
Nitrocellulosemembran (0,2 µm)	Kisker Biotech, Steinfurt
PCR-Reaktionsgefäße (0,2 ml)	Sarstedt, Nürmbrecht
Pipettenspitzen, Kunststoff	Sarstedt, Nürmbrecht
Platte F. Suspensionskultur, 48 Well, steril	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen
Polyethylenröhrchen (10/50 ml)	Sarstedt, Nürmbrecht
Protein A MicroBeads	Miltenyi Biotec GmbH, Bergisch Gladbach
Quarzküvetten (0,1/1 cm Schichtdicke)	Hellma, Müllheim
Slide-A-Lyzer® Dialyse-Kassetten MWCO 10,000	Thermo Fisher Scientific Inc., Rockford, USA
Spritzenfilter steril (Porengröße 0,22 µm)	Roth, Karlsruhe
Ultrafiltrationsäule Vivaspin 500	Sartorius Stedim Biotech, Aubagne (F)
Ultrazentrifugationsröhrchen (12 ml)	Herolab, Wiesloch
UV-Star. Platte, 96 Well	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen
Whatman-Filterpapier	Schleicher & Schuell BioScience, Dassel
Zellkulturflaschen, -schalen	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen/ Sarstedt, Nürmbrecht
Zellschaber	Sarstedt, Nürmbrecht

2.1.10. Chromatographiematerialien

Material	Bezugsquelle
Butyl-Sepharose	GE Healthcare, München
Fractogel EMD-SO ₃ , EMD DEAE, EMD TMAE, EMD Propyl	Merck, Darmstadt
Hydroxylapatit	Merck, Darmstadt
Ni-NTA	Qiagen, Hilden
Protino®-Ni-IDA, Protino®-Ni-TED	Macherey-Nagel, Düren
StrepTactin	IBA, Göttingen
Talon™	Clontech, Saint-Germain-en-Laye;

2.1.11. Enzyme

Enzym	Anwendung	Bezugsquelle
Antarktische Phosphatase	Dephosphorylierung der 5'-Phosphatgruppen von DNA	New England Biolabs, Frankfurt a.M.
DNA Polymerase I, Large (Klenow) Fragment	Auffüllen von 5'-DNA-Überhängen	New England Biolabs, Frankfurt a.M.
<i>Pfu</i> Polymerase	PCR	Promega, Madison, USA
Restriktionsendonukleasen	Restriktion von DNA	New England Biolabs, F.; Fermentas, St. Leon-Rot
RNAse A	Degradation von RNA in Plasmid-lösungen und Zellsuspensionen	Roth, Karlsruhe
<i>Taq</i> Polymerase	PCR	peqLab, Erlangen
T4-DNA-Ligase	Ligation von DNA-Fragmenten	New England Biolabs, Frankfurt a.M.

2.1.12. Längenstandards

Standard	Anwendung	Bezugsquelle
SmartLadder DNA Standard	Fragmentgrößen: 200/400/600/800/1000/1500/2000/2500/3000/ 4000/5000/6000/8000/10000 bp	Eurogentec
Labor-Proteinstandard	Markergrößen: 14,4/20/30/43/67/116/170/212 kDa	
PageRuler. Prestained Protein Ladder	Markergrößen: 11/17/26/34/43/56/72/95/130/170 kDa	Fermentas, St. Leon-Rot

PageRuler. Prestained Protein Ladder Plus	Markergrößen: 11/17/28/36/55/72/95/130/250 kDa	Fermentas, St. Leon-Rot
Precision Plus Protein Standard All Blue	Markergrößen: 10/15/20/25/37/50/75/100/150/250 kDa	Bio-Rad Laboratories, München
Protein Molecular Weight Marker	Markergrößen: 14,0/18,4/28,5/37,6/66,2/97,4/116,0 kDa	Jena Bioscience
Peggold Protein Marker I	Markergrößen: 14,4/18,4/25,0/35,0/45,0/66,2/116,0 kDa	Peqlab, Erlangen

2.1.13. Kommerzielle Reagenziensätze und Medien, Kits

System	Anwendung	Bezugsquelle
BacVector serumfreies Medium	Medium zur serumfreien Kultivierung von Sf9-Insektenzellen	Novagen, Darmstadt
DMEM (<i>Dulbeccos modified Eagle Medium</i>)	Medium zur Kultivierung von HeLa-Zellen	PAA Laboratories GmbH, Pasching, Österreich
Fötales Kälberserum (FCS)	Zur Komplementierung von TC 100-Zellkulturmedium	Gibco BRL
FuGENE®HD Transfektionsreagenz	Transfektion von Sf9-Insektenzellen	Promega GmbH, Mannheim
Immun-Star™ AP-Substrat	Nachweis von Proteinen nach Western Blot durch Chemilumineszenz	Bio-Rad Laboratories, München
Insect GeneJuice™ Transfektionsreagenz	Transfektion von Sf9-Insektenzellen	Novagen, Darmstadt
Insect PopCulture™-Reagenz	Lyse von Sf9-Zellen	Novagen, Darmstadt
μMACS Protein G <i>MicroBeads</i> Kit	Immunopräzipitation	Miltenyi Biotec GmbH, Bergisch Gladbach
peqGold Plasmid Miniprep Kit I	Plasmidpräparation	peqlab, Erlangen
peqGold Plasmid Midiprep Kit I	Plasmidpräparation	peqlab, Erlangen
Roti®Nanoquant	Bradford-Test zur Bestimmung der Proteinkonzentration	Roth, Karlsruhe
SF 900 II serumfreies Medium	Medium zur serumfreien Kultivierung von Sf9-Insektenzellen	Invitrogen, Carlsbad, California, USA
Super Signal West Femto Maximum Sensitivity Substrat	Nachweis von Proteinen nach Western Blot durch Chemilumineszenz	Thermo Fisher Scientific Inc., Rockford, USA
Super Signal West Pico Maximum Sensitivity Substrat	Nachweis von Proteinen nach Western Blot durch Chemilumineszenz	Thermo Fisher Scientific Inc., Rockford, USA

Super Signal West Pico Stable Peroxid Solution	Nachweis von Proteinen nach Western Blot durch Chemilumineszenz	Thermo Fisher Scientific Inc., Rockford, USA
TC 100-Medium	Medium zur Kultivierung von <i>Sf9</i> - und <i>HiV</i> -Insektenzellen	Bio Whittaker, Verviers, Belgien
Thrombin-Kit	Abverdau de His-Tags H6_MCM8	Novagen, Darmstadt
UltraMobius 200 Plasmid Kit	Präparation endotoxinfreier DNA für Transfektion	Novagen, Darmstadt
QIAEX II Gel Extraction Kit	DNA-Elution aus Agarose, Aufreinigung von PCR-Produkten	Qiagen, Hilden
BacMagic™ DNA-Kit	Generierung rekombinanter Baculoviren	Novagen, Darmstadt

2.1.14. Antikörper

Antikörper	Beschreibung	Bezugsquelle
α-CDC45 3G10	Primärantikörper gegen hCDC45, IgG monoklonal aus der Ratte, Hybridoma, produziert für die Abteilung Biochemie am Fritz-Lipmann-Institut	(Bauerschmidt <i>et al.</i> , 2007)
α-CDC45 H300	Primärantikörper gegen den N-Terminus von hCDC45 (Aminosäure 1-300), IgG polyklonal aus dem Kaninchen	Santa Cruz Biotechnology, Inc., Santa Cruz, California USA
α-CDC45 P-3	Primärantikörper gegen hCDC45, IgG polyklonal aus dem Meerschweinchen, produziert für die Abteilung Biochemie am Fritz-Lipmann-Institut	Labor F.Grosse, FLI Jena
α-His6	Primärantikörper gegen Histidin-Tag aus der Maus	Sigma-Aldrich, München
α-HA	Primärantikörper gegen Hämagglutinin-Tag aus der Maus	Sigma-Aldrich, München
α-MCM8 (1-92)	Primärantikörper gegen den N-Terminus von MCM8 (Aminosäure 1-92), IgG polyklonal aus dem Kaninchen	(Volkening & Hoffmann, 2005)
α-MCM8 (741-756)	Primärantikörper gegen den C-Terminus von MCM8 (Aminosäure 741-756), IgG polyklonal aus dem Kaninchen	(Volkening & Hoffmann, 2005)
α-MCM8 full	Serum gegen MCM8, IgG polyklonal aus dem Kaninchen	Labor I. Hoffmann, DKFZ Heidelberg

α -MCM8 K15	Primärantikörper gegen MCM8, IgG polyklonal aus der Ziege	Santa Cruz Biotech. Inc., Santa Cruz, CA, USA
StrepTactin-AP	Primärantikörper gegen StreptII-Tag, alkalische Phosphatase Konjugat	Alkalische Phosphatase IBA, Göttingen
α -MCM2 (N19)	Primärantikörper gegen den N-Terminus von MCM2, IgG polyklonal aus der Ziege	Santa Cruz Biotech. Inc., Santa Cruz, CA, USA
α -MEK-2	Primärantikörper gegen den N-Terminus von MEK-2, IgG monoklonal aus der Maus	BD Biosciences, Heidelberg
α -PCNA (PC10)	Primärantikörper gegen PCNA p36 Protein, IgG monoklonal aus der Maus	Santa Cruz Biotech. Inc., Santa Cruz, CA, USA
α -Kaninchen IgG <i>light chain specific</i> HRP	Sekundärantikörper gegen Kaninchen-Primärantikörper, Meerrettichperoxidase-Konjugat, aus der Ziege	Jackson ImmunoResearch, Baltimore, USA
α -Maus-AP	Sekundärantikörper gegen Maus-Primärantikörper, alkalische Phosphatase Konjugat, aus dem Kaninchen	Jackson ImmunoResearch, West Grove, USA
α -Ratte IgG <i>light chain specific</i> HRP	Sekundärantikörper gegen Ratte-Primärantikörper, Meerrettichperoxidase-Konjugat, aus der Ziege	Jackson ImmunoResearch, Baltimore, USA
K32Pre Serum	Serum aus Kaninchen, verwendet als unspezifischer Antikörper für Immunopräzipitation	H.Pospiech, FLI Jena

2.1.15. Geräte

Gerät	Bezugsquelle
AGFA Classic E.O.S. Dunkelkammerentwicklungsmaschine	Siemens, Erlangen
Autoklav	Webeco, Selmsdorf
Blot-Apparatur Panther.Semidry Electrobloetter HEP-1	Thermo Scientific Owl Separation Systems, Rochester NY (USA)
Brutschrank	Memmert, Schwabach
CO ₂ -Inkubator	Sanyo, Bad Nenndorf
Dounce Homogenizer	Wheaton Science International, Millville, USA
Elektrophoreseapparaturen für Agarose- und PAA-Gele	Technik, Universität Bayreuth
Elektrophoreseapparaturen <i>mighty small</i>	Hoefer, Holliston MA (USA)
Elektrophoreseapparatur (groß)	Roth GmbH, Karlsruhe
Elektrophoreseapparatur (klein)	Biometra, Göttingen
Eismaschine	ZIEGRA, Isernhagen

FACS Calibur	Becton Dickinson, Heidelberg
Feinwaage 1201 MP2	Sartorius, Göttingen
Fluoreszenz-Spektrometer LS-50B	Perkin Elmer, Waltham MA (USA)
FPLC LKB Gradient Pump 2249/LKB 2238 Uvicord SII/LKB 2210 Recorder	GE Healthcare, München (ehem. Pharmacia)
Geldokumentation UV-Transilluminator	Intas, Göttingen
Geltrockenapparatur Minidry D61	Biometra, Göttingen
HPLC System Gold 125P Solvent Module/168 detector	Beckman, Krefeld
Inkubator MIR-553, MIR-253	Sanyo, Bad Nenndorf
Inkubator Multitron 2	HT Infors, Bottmingen, Schweiz
InstantImager 2024	Perkin Elmer, Waltham MA (USA) (ehem. Canberra Packard, Schwadorf, Österr.)
Kontaminationsmonitor LB 122	Berthold GmbH & Co. KG, Bad Wildbad
Kontaminationsmonitor LB 145	Berthold GmbH & Co. KG, Bad Wildbad
Kühlzentrifuge Mikro 22R	Hettich, Tuttlingen
Magnet-Heizrührer RETbasic	IKA Laborbedarf, Staufen
Mikroliterpipetten (10/100/1000 µl)	Eppendorf, Hamburg
Mikroskop Nikon Eclipse TS100	Zeiss Lichtmikroskopie, Göttingen
Neubauer-Zählkammer	Roth, Karlsruhe
Peristaltikpumpe Pump P-1	GE Healthcare, München (ehem. Pharmacia)
pH-Meter MP220	Mettler Toledo, Greifensee (CH)
Plattenlesegerät (Universal Microplate Spectralphotometer)	MWG-Biotech, Ebersberg
Röntgenfilme Kodak® BioMax MR Film	Sigma-Aldrich, München
Spannungsquelle EV 243	Consort, Turnhout (B)
Speed-Vac-Konzentrator BA-VC-300H	H. Saur Laborbedarf, Reutlingen
Spektralphotometer DU640	Beckman, Krefeld
Spektropolarimeter Jasco J-600	JASCO GmbH, Groß-Umstadt
Steril- und Sicherheitswerkbank	Integra Bioscience, Fernwald
Thermocycler Tpersonal	Biometra, Göttingen
Thermomixer comfort	Eppendorf, Hamburg
Thermoschüttler Thermoshake	Gerhardt, Königswinter
Tischzentrifuge 5415 R	Eppendorf, Hamburg
Trans-Blot Semi-dry transfer cells	Bio-Rad Laboratories, München
Ultraschallbad Sonorex Super RK106	Bandelin, Berlin
Ultraschallstab Sonifier B15 bzw. 450	Branson, Danbury CT (USA)
Ultrazentrifuge Centrikon T-1055	Kontron Instruments, Neufahrn
Vortexer REAX 2000	Heidolph, Schwabach

Waage TE 1502 S	Sartorius, Göttingen
Wasserbad	Köttermann, Uetze/Hänigsen
Zentrifuge Sorvall RC6 Plus	Thermo, Waltham MA (USA)

2.1.16. Software

Programm	Anwendung	Bezugsquelle
CellQuest Pro	Analyse FACS Calibur	Becton Dickinson, Heidelberg
Expasy Proteomic Server	Proteinanalyse	http://www.expasy.ch/
KC4	Plattenleser	BioTek, Bad Friedrichshall
MS Office	Excel, Powerpoint, Word	Microsoft GmbH (D), Unterschleißheim
NCBI	Literaturrecherche	http://www.ncbi.nlm.nih.gov/
Rare Codon Caltor	Berechnung der Anzahl seltener Codons	http://people.mbi.ucla.edu/sumchan/caltor.html
UniProt	Alignment von Aminosäuresequenzen	http://www.uniprot.org
VectorNTI Suite7	In-silico-Klonierung	InforMax, Bethesda MD (USA)
Winmdi28	Auswertung FACS Calibur	http://facs.scripps.edu/software.html

2.2. Methoden

2.2.1. Methoden im Umgang mit *E.coli*

2.2.1.1. Kultivierung von *E. coli*

LB (Luria-Bertani) Medium: 1 % (w/v) Trypton, 0,5 % (w/v) Hefeextrakt, 1 % (w/v) NaCl

Psi-Medium: 5 g/l $MgCl_2$, 20 g/l Trypton, 5 g/l Hefeextrakt, pH 7,6 mit NaOH

Fakultative Zusätze	Stammlösung	Konzentration	Lösungsmittel
IPTG	100x	100 mM	H ₂ O
Ampicillin	1000x	100 µg/ml	H ₂ O, sterilfiltriert
Kanamycin	1000x	50 µg/ml	H ₂ O, sterilfiltriert
Chloramphenicol	1000x	34 µg/ml	70% Ethanol

Bakterienmedien wurden mit VE-Wasser (voll entsalzt) angesetzt und im Autoklaven für 20 min bei 121 °C, 2 bar autoklaviert. Dem Grundmedium wurde bei der Herstellung von Festmedium vor dem Autoklavieren 1,5 % (w/v) Agar zugesetzt. Hitzelabile fakultative Zusätze wurden den Flüssigmedien nach Erkalten, den Festmedien nach Abkühlen auf etwa 50 °C zugegeben. Die finalen Antibiotikakonzentrationen wurden durch Zugabe der entsprechenden Antibiotika-Stammlösungen erreicht. Zur Kultivierung der Bakterienzellen wurden diese zunächst aus einem angetauten Glycerinstock auf LB - Platten mit den entsprechenden Antibiotika ausgestrichen und über Nacht bei 37 °C inkubiert. Zur Anzucht von Übernachtskulturen (ÜNK) wurde eine Bakterienkolonie im gewünschten Volumen LB-Medium mit den entsprechenden Antibiotika resuspendiert und bei 37 °C auf dem Rotationschüttler für 10 - 16 h bis zur erforderlichen Zelldichte inkubiert. Zur Anzucht von Übertagkulturen (ÜTK) wurde 0,01 vol. einer ÜNK in LB-Medium mit entsprechendem Antibiotikum bis zum Erreichen der erforderlichen Zelldichte inkubiert.

2.2.1.2. Herstellung von Calciumchlorid-kompetenten *E.coli*

Zur Herstellung von Calciumchlorid-kompetenten Zellen wurden 200 ml LB-Medium mit 2 ml einer *E. coli* DH5α bzw. BL21 ÜNK beimpft, bei 37 °C unter Schütteln inkubiert. Nach Erreichen einer OD_{600} von 0,5 wurde die Kultur für 1 h auf Eis gekühlt. Alle weiteren Schritte wurden auf Eiswasser durchgeführt. Die Zellen wurden durch Zentrifugation sedimentiert (5 min; 5000 rpm; 4 °C in einem SLA3000 autoklavierten Zentrifugenbecher, Zentrifuge Sorvall RC6 Plus, Thermo Scientific) und mit 100 ml kaltem 0,1 M $CaCl_2$ gewaschen und wie oben zentrifugiert. Anschließend wurden sie in 20 ml kaltem 0,1 M $CaCl_2$ aufgenommen und mindestens 1 h auf Eis inkubiert. Die Bakteriensuspension wurde auf 15 % Glycerin eingestellt, aliquotiert, in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei –70 °C gelagert.

2.2.1.3. Herstellung von Rubidiumchlorid-kompetenten *E. coli*

1x Tfb I: 30 mM KOAc, 50 mM MnCl₂, 100 mM RbCl, 10 mM CaCl₂, 15% (v/v) Glycerin, pH 5,8 mit HAc

1x Tfb II: 10 mM NaMOPS, 75 mM CaCl₂, 10 mM RbCl, 15% (v/v) Glycerin, pH 6,5 mit NaOH

Zur Herstellung von Rubidiumchlorid-kompetenten Zellen wurden 500 ml Psi-Medium mit 5 ml einer *E. coli* ÜNK beimpft, bei 37 °C unter Schütteln inkubiert. Nach Erreichen einer oD₆₀₀ von 0,5 wurde die Kultur für 1 h auf Eis gekühlt. Alle weiteren Schritte wurden auf Eiswasser durchgeführt. Die Bakterien wurden durch Zentrifugation sedimentiert (5 min; 5000 rpm; 4 °C in einem SLA3000 autoklavierten Zentrifugenbecher). Anschließend wurden sie mit 100 - 200 ml eiskaltem TfbI-Puffer gewaschen und wie oben zentrifugiert. Daraufhin wurden die Zellen in 10 - 20 ml eiskaltem TfbII-Puffer aufgenommen, aliquotiert, in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei –70 °C gelagert.

2.2.1.4. Transformation von kompetenten *E. coli*

Die Transformation von *E. coli* wurde nach einer modifizierten Anleitung von Hanahan (Hanahan, 1983) durchgeführt. Zu 1 - 50 µl einer DNA-Lösung (z. B. Plasmidlösung oder Ligationsansatz) wurden 50 - 100 µl kompetente Zellen gegeben und 30 - 60 min auf Eis inkubiert. Die Zellen wurden für 90 s bei 42 °C hitzebehandelt, 15 min auf Eis abgekühlt und nach Zugabe von je 1 ml LB-Medium 1 h im Thermoschüttler bei 37 °C inkubiert. Anschließend wurden 50 - 200 µl der Suspension auf LB-Festmedium mit dem entsprechenden Antibiotikum ausplattiert.

2.2.1.5. Expression von Protein in *E.coli*

Soweit nicht anders erwähnt, wurde der Stamm *E. coli* BL21 (DE3) CodonPlus-RIL für die Überexpression von MCM8 verwendet. BL21 CodonPlus-RIL enthält zusätzliche Kopien der in *E. coli* natürlicherweise selten vorkommen tRNA-Gene AUA (*ileY*), AGG, AGA (beide *argU*), CUA (*leuW*). Des Weiteren ist dieser Stamm defizient für die Proteasen Lon und OmpT. *E. coli* BL21 CodonPlus-RIL ist deshalb insbesondere für die Expression heterologer Proteine geeignet. Außerdem enthält er eine Kopie der T7 RNA-Polymerase unter der Kontrolle des lac-Promotors. Dies macht eine Verwendung des pET-Systems (Studier & Moffatt, 1986) zur Überexpression von Proteinen nach Induktion mit IPTG möglich.

2.2.1.5.1. Test auf Überexpression in 48-Well-Platte

Zur Überprüfung der Überexpression von MCM8 wurde *E. coli* mit den entsprechenden Plasmiden (2.1.5) transformiert. Drei *E. coli*-Kolonien der zu exprimierenden Proteinvariante wurden in jeweils

750 µl LB-Medium in eine 48-Well-Platte überimpft. Eine der drei Kolonien wurde als Negativkontrolle in ein zusätzliches Well mit 750 µl LB überimpft. Die ÜTK wurden bei 37 °C bis zum Erreichen einer OD_{600} von 0,5 unter Schütteln inkubiert. Zum Anlegen einer Glycerinkryokultur wurden anschließend 200 µl jeder Kultur abgenommen, mit 20 µl sterilem 80%-igem Glycerin versetzt und bei -70°C gelagert. Durch Zugabe von 1 mM IPTG zu den restlichen 550 µl wurde die Proteinexpression induziert. Die Negativkontrolle blieb uninduziert. Nach 4 h wurden 200 µl jeder Kultur abgenommen und die Zellen für 1 min bei 4 °C mit 15000 g sedimentiert. Das Sediment wurde in 20 µl H₂O resuspendiert und die Zellen durch 10-minütige Inkubation bei 95 °C und 10-minütiger Ultraschallbehandlung (Sonorex Super RK 106, Bandelin) aufgeschlossen. Daraufhin wurden die Proben mit 20 µl Probenauftragspuffer (2.2.7.2/3) und 6 M Harnstoff versetzt, noch einmal für 5 - 10 min bei 95 °C inkubiert und der Gesamtzellextrakt anschließend mittels SDS-Gelelektrophorese analysiert. Die Überexpression nach Induktion wurde durch die Visualisierung einer neu auftretenden Bande auf Höhe des entsprechenden Molekulargewichts nachgewiesen.

2.2.1.5.2. Test auf Überexpression in Mini-Fermenter (bei Chaperon-Coexpression)

Zur Überprüfung der Überexpression von MCM8 bei gleichzeitiger Expression von Chaperonen wurde *E. coli* BL21 mit den entsprechenden Plasmiden (2.1.5) co-transformiert. Je enthaltenem Chaperon-Plasmid wurde eine ÜNK von einer *E. coli*-Kolonie in jeweils 2 ml LB-Medium in einem sterilen 15 ml Reaktionsgefäß angesetzt. 100 ml LB-Medium wurden mit den entsprechenden Antibiotika im 500 ml-Mini-Fermenter mit 350 µl der ÜNK beimpft. Zur Überprüfung optimaler Expressionsbedingungen wurde die Kultivierung daraufhin bei 15 °C, Raumtemperatur bzw. 37 °C durchgeführt. Die Zellen wurden bis zu einer OD_{600} von 0,5 - 1,6 inkubiert. Zum Anlegen einer Glycerinkryokultur wurden 200 µl jeder Kultur abgenommen, mit 20 µl sterilem 80%-igem Glycerin versetzt und bei -70°C gelagert. Anschließend wurde die Expression von MCM8 sowie der Chaperone durch Zugabe der entsprechenden Induktoren induziert:

MCM8:	1 mM IPTG
pGro7:	2,5 g/l L-Arabinose für die Chaperone groES und groEL
pKJE7:	2,5 g/l L-Arabinose für die Chaperone dnaK, dnaJ und grpE
pG-KJE8:	5 g/l L-Arabinose für die Chaperone dnaK, dnaJ und grpE sowie 2,5 ng/ml Tetracyclin für die Chaperone groES und groEL
pTf16:	2,5 g/l L-Arabinose für den <i>E. coli</i> Triggerfaktor
pG-Tf2:	2,5 ng/ml Tetracyclin für die Chaperone groES, groEL sowie den <i>E. coli</i> Triggerfaktor

Die Zellen wurden bis zum Erreichen einer OD_{600} von 0,8 - 3,5 weiter inkubiert. Anschließend wurden sie durch Zentrifugation bei 5000 rpm 10 min 4 °C (SS34-Rotor, Zentrifuge Sorvall RC6 Plus, Thermo Scientific) sedimentiert. Das Zellsediment wurde anschließend aufgeschlossen (2.2.1.7) und die lösliche sowie die unlösliche Fraktion per SDS-PAGE analysiert.

2.2.1.5.3. Fermentation in 4L-Fermenter

Zur Vorbereitung der Fermentation wurde von einem Ausstrich einer positiv getesteten Glycerinkryokultur (2.2.1.5.1/2) eine 10 ml - ÜNK in LB-Medium mit den entsprechenden Antibiotika angelegt. Mit 5 ml der ÜNK wurden 4 L LB-Medium mit den entsprechenden Antibiotika in einem Glas-Fermentationsbehälter angeimpft. Die Fermentation der Zellen erfolgte bei 15 – 37 °C. Nach Erreichen einer OD_{600} von 0,5 - 0,9 wurde die Proteinexpression durch Zugabe von 1 mM IPTG sowie ggf. der entsprechenden Induktoren zur Chaperon-Expression (siehe 2.2.1.5) induziert. Nach Erreichen einer OD_{600} von 2,0 - 4,3 wurden die Zellen durch Zentrifugation sedimentiert (8 min, 8000 rpm, 4 °C in einem autoklavierten SLA3000-Zentrifugenbecher, Zentrifuge Sorvall RC6 Plus, Thermo Scientific) und bis zur weiteren Verwendung aufbewahrt.

2.2.1.6. Herstellung von *E.coli*-Zellextrakten

PBS: 10 mM Na_2HPO_4 ; 1,8 mM KH_2PO_4 ; 140 mM NaCl; 2,7 mM KCl; pH 7,4

Harnstoff-Lysepuffer: 100 mM Tris-HCl pH8, 8M Harnstoff

Denaturierungspuffer: 50 mM Na-Phosphat pH 8,0; 300 mM NaCl; 8M Harnstoff

Für den Zellaufschluss wurde ein Zellsediment in PBS (1% des Kulturvolumens) resuspendiert. Zur Degradation der Zellwand und der periplasmatischen Membran wurden 1% des Zellsuspensionsvolumens Lysozym (Stammlösung 100g/l) und 2% des Zellsuspensionsvolumens TritonX-100 (5%ige Lösung) zugegeben. Zur Verhinderung eines möglichen proteolytischen Abbaus des Proteins wurde je 40 ml Zellsuspension eine Tablette Complete EDTA-free Protease Inhibitor Mix (Roche, Mannheim) zugesetzt. Alle folgenden Schritte wurden bei 4 °C durchgeführt. Die resuspendierten Zellen wurden durch Sonifizierung (Sonifier B15, Branson) für 5 min bei Ultraschallstufe 4,5 mit 50% Leistung (*pulsed*) aufgeschlossen. 30 µl des Gesamtzellextrakts wurden entnommen, mit 10 µl Proteinauftragepuffer (2.2.7.2/3) versetzt und durch SDS-PAGE analysiert. Anschließend wurden die Zelltrümmer durch Zentrifugation (20 min, 20000 g, 4 °C) sedimentiert. 30 µl des Überstandes wurden entnommen, mit 10 µl Proteinauftragepuffer (2.2.7.2/3) versetzt und durch SDS-PAGE analysiert. Der Überstand (Zellextrakt) wurde bis zur Proteinaufreinigung am selben Tag auf 4 °C gelagert. Die sedimentierten Zelltrümmer wurden in Harnstoff - Lysepuffer (25% des Zellsuspensionsvolumens) resuspendiert, um die im Sediment enthaltenen unlöslichen Proteine zu analysieren. Nach einer nochmaligen Zentrifugation (20 min, 20000 g, 4 °C) wurden 30 µl des harnstoffhaltigen Überstandes entnommen, mit 10 µl Proteinauftragepuffer (2.2.7.2/3) versetzt und durch SDS-PAGE analysiert. Sollte aus dem Zelltrümmersediment unlösliches MCM8 denaturierend aufgereinigt werden, wurde das Sediment zunächst mit 25 ml Puffer A (2.2.6.1.1) gewaschen und durch Zentrifugation (30 min. 10000g, 4 °C) sedimentiert. Anschließend wurde das Sediment in 25 ml Denaturierungspuffer resuspendiert, 1 h auf Eis inkubiert und anschließend die noch unlöslichen Bestandteile durch Zentrifugation (30 min. 10000g, 4 °C) sedimentiert. Der Überstand (Harnstoff-Extrakt) wurde bis zur Proteinaufreinigung am selben Tag auf 4 °C gelagert.

2.2.2. Methoden im Umgang mit *S. cerevisiae*

2.2.2.1. Kultivierung von *S. cerevisiae*

Hefemedien wurden mit VE-Wasser (voll entsalzt) angesetzt und im Autoklaven für 20 min bei 121 °C, 2 bar autoklaviert. Dem Grundmedium wurde bei der Herstellung von Festmedium vor dem Autoklavieren 1,5 % (w/v) Agar zugesetzt. Hitzelabile fakultative Zusätze wurden den Flüssigmedien nach Erkalten, den Festmedien nach Abkühlen auf etwa 50 °C zugegeben. Aminosäuren wurden jeweils als 250 - 500fache Stammlösungen angesetzt, steril filtriert und den Medien nach dem autoklavieren zugegeben.

Minimalmedium: 0,67% YNB, 4 mg/l Adenin, 20 mg/l Histidin, 30 mg/l Leucin, 30 mg/l Lysin, 20 mg/l Methionin, 20 mg/l Tryptophan, 20 mg/l Uracil, 2% Glukose bzw. Galaktose

Selektives Minimalmedium (SDGlu_{-Ura/-Leu} oder SDGal_{-Ura/-Leu}): Minimalmedium ohne Leucin- bzw. Uracilzusatz

Vollmedium (YPGlu bzw. YPGal): 1% Hefeextrakt, 2% Pepton, 2% Glukose bzw. Galaktose

Zur Kultivierung der Hefezellen wurde diese zunächst aus einem angetauten Glycerinstock auf YPGlu-Platten ausgestrichen und über 3 Tage bei 30 °C inkubiert. Zur Anzucht von Übernachtskulturen (ÜNK) wurde eine Hefekolonie im gewünschten Volumen YPGlu-Medium resuspendiert und bei 30 °C auf dem Rotationschüttler für 12 - 16h inkubiert. Zur Anzucht von Übertagkulturen (ÜTK) wurde 0,1 vol. einer ÜNK in YPGlu-Medium bis zur erforderlichen Zelldichte inkubiert. Transformierte Hefezellen wurden in Minimalmedium kultiviert.

2.2.2.2. Herstellung von PEG-kompetenten *S. cerevisiae* (Dohmen *et al.*, 1991)

SBED-Einfriermedium: 1 M Sorbitol, 10 mM Bicin-NaOH pH 8,35, 3% Ethylenglycol, 5% DMSO

Zur Herstellung PEG-kompetenter *S. cerevisiae* wurden 50 ml YPGlu-Medium mit 5 ml einer *S. cerevisiae* ÜNK beimpft, bei 30 °C unter Schütteln inkubiert und nach Erreichen einer OD_{600} von 0,6 - 1,5 für 5 min auf Eis gehalten. Alle weiteren Schritte wurden auf Eiswasser durchgeführt. Die Hefezellen wurden durch Zentrifugation sedimentiert (5 min; 10000 rpm; 4 °C in einem SS34 autoklaviertem Zentrifugenbecher). Anschließend wurden sie mit 25 ml SBED-Medium gewaschen und wie oben sedimentiert. Daraufhin wurden die Zellen in 2 ml SBED-Medium aufgenommen, aliquotiert, mit flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -70 °C gelagert.

2.2.2.3. Transformation von *S. cerevisiae*

Zu 200 µl gefrorenen kompetenten Hefezellen wurden 2,7 µg der entsprechenden Plasmid-DNA (2.1.5) gegeben und für 5 min bei 30 °C und 650 rpm geschüttelt. Anschließend wurden 1,4 ml 40% PEG in 0,2 M Bicin-NaOH pH 8,35 zugegeben und durch invertieren gemischt. Die Zellen wurden daraufhin für 1 h bei 30 °C inkubiert und danach durch Zentrifugation (5 min; 3500 rpm) sedimentiert. Das Sediment wurde in 1,6 ml 0,15 M NaCl in 10 mM Bicin-NaOH pH 8,35 durch invertieren resuspendiert und wie oben zentrifugiert. Anschließend wurde das Sediment in 80 µl 0,15 M NaCl in 10 mM Bicin-NaOH pH 8,35 resuspendiert und zur Selektion der Plasmid-tragenden Kandidaten auf SDGlu_{-Ura}-Platten ausgestrichen.

2.2.2.4. Test-Expression von Protein in *S. cerevisiae*

Zum Test der Expression von Protein wurden je 10 ml SD_{-Ura-Leu}-Medium mit einer Plasmid-tragenden Hefe-Kolonie beimpft und 48 h bei 30 °C unter Schütteln inkubiert. Je Vorkultur wurden 2 x 2 ml Zellen entnommen und durch Zentrifugation (1 min, 5000 rpm) sedimentiert. Der Überstand wurde verworfen und die Zellen im Rückfluss resuspendiert. Die Zellen aus je 2 ml Vorkultur wurden einmal in 10 ml YPGlu (uninduzierte Kontrolle) und einmal in 10 ml YPGal (zur Proteinexpression) überimpft. Nach 24 h Wachstum wurden die Zellen durch Zentrifugation sedimentiert (5 min, 5000 rpm). Die Zellsedimente wurden bis zur weiteren Analyse bei 4 °C bzw. -20 °C aufbewahrt.

2.2.2.5. Herstellung von *S. cerevisiae*-Zellextrakt (Horvath & Riezman, 1994)

HT-Lysepuffer: 0,06 M Tris-HCl pH 6,8, 10% Glycerin, 2% SDS, 5% 2-Mercaptoethanol

Ein Zellsediment aus 2 ml Expressionskultur wurde mit 1 ml VE-H₂O gewaschen, durch Zentrifugation sedimentiert (5 min, 5000 rpm) und in 80 µl HT-Lysepuffer resuspendiert. Die resuspendierten Zellen wurden für 5 min bei 95 °C aufgeschlossen und anschließend bei 13.200 rpm 5 min zentrifugiert. Der Überstand wurde mit Proteinauftragepuffer (2.2.7.2/3) versetzt und per SDS-PAGE und Western-Blot (2.2.7.4.2) analysiert.

2.2.3. Methoden im Umgang mit Insektenzellen

2.2.3.1. Kultivierung von Sf9-Insektenzellen

2.2.3.1.1. Auftauen

Kryoröhrchen mit gefrorenen Zellen wurden unter leichtem Schwenken in einem Wasserbad (27 °C) vollständig aufgetaut. Anschließend wurden die Zellen in ein steriles 50 ml Reaktionsgefäß überführt. Tropfenweise wurde 5 ml vorgewärmtes Medium (ohne Antibiotika) zugegeben und durch vorsichtiges auf- und abpipettieren gemischt. Die Zellsuspension wurde in eine sterile Zellkulturflasche (25 cm²) überführt und die Zellen durch leichtes Schwenken gleichmäßig verteilt. Nach Inkubation bei 27 °C für 30 - 60 min wurde die Adhärenz mikroskopisch überprüft. Anschließend wurde der Überstand abpipettiert und gegen 5 ml frisches, vorgewärmtes Medium ausgetauscht.

Die Zellen wurden solange bei 27 °C inkubiert, bis der Zellrasen (Monolayer) zu 85 - 95% konfluent (geschlossen) war. Die Konfluenz und Viabilität (Trypanblau-Methode, 2.2.3.1.3) wurden täglich mikroskopisch überprüft. Das Medium wurde alle 2 Tage ausgetauscht.

2.2.3.1.2. Kultivierung

Die Kultivierung der Sf9-Zellen als Monolayer erfolgte bei 27 °C und 95% Luftfeuchtigkeit in 25 cm², 75 cm² und 175 cm² TC-Flaschen. Es wurde entweder SF 900 II serumfreies Medium (Invitrogen) oder TC 100-Medium (Bio Whittaker) verwendet, welches mit 10 % fötalem Kälberserum (FCS) komplementiert wurde. Die Medien wurden stets auf 27 °C vorgewärmt. Bei einer Konfluenz des Monolayers von 80 - 95% wurden die Zellen passagiert = aufgeteilt. Hierfür wurden die Zellen durch auf- und abziehen mit der Pipette vom Flaschenboden gelöst. War dies nicht möglich, wurden die Zellen mit Hilfe eines Zellschabers abgelöst. Zur Bestimmung der Anzahl lebender Zellen (Trypanblau-Methode, 2.2.3.1.3) wurden die Zellen gezählt und wie folgt neu ausgesäht:

Flaschengröße	Zellzahl	Volumen Medium
25 cm ²	1 x 10 ⁶	5 ml
75 cm ²	3 x 10 ⁶	10 ml
175 cm ²	6 x 10 ⁶	30 ml

Für die Kultivierung in Suspensionskultur wurden die Zellen bei 4 x 10⁶ Zellen/ml passagiert und à 10 ml in sterilen 100 ml-Kolben zu 0,5 x 10⁶ Zellen/ml ausgesäht.

2.2.3.1.3. Bestimmung der Zellzahl durch Trypanblau-Ausschluss

Mit dieser Methode wurde die Anzahl lebender Zellen in einer Zellsuspension bestimmt. Trypanblau dringt nur in tote Zellen ein, so dass diese unter dem Mikroskop von den lebenden Zellen unterschieden werden können.

In einer 96-Well-Platte (Rundboden) wurden 10 µl Zellsuspension mit 10 µl Trypanblau-Lösung gemischt. Mit diesem Gemisch wurde eine Neubauer-Zählkammer gefüllt. Zur Bestimmung der Zellzahl wurden mindestens 3 Großquadrate ausgezählt.

Die Zahl der lebenden Zellen/ml wurde nach folgender Formel bestimmt:

$$\text{Zellen/ml} = \text{Zellzahl lebender Zellen} / \text{Anzahl Großquadrate} \times \text{Verdünnungsfaktor} \times 10^4$$

2.2.3.1.4. Einfrieren von Sf9-Zellen

Für die Langzeitaufbewahrung wurden Insektenzellen eingefroren und in flüssigem Stickstoff gelagert. In Suspension gewachsene Zellen wurden bei 100 g für 5 - 10 min abzentrifugiert und der Überstand (konditioniertes Medium) abgenommen. Zur Herstellung von Einfriermedium wurden 50% frisches SF-900II SFM mit 50% konditioniertem Medium sowie 7,5 % DMSO gemischt. Das Zellsediment wurde in Einfriermedium zu einer finalen Zelldichte von $>1 \times 10^7$ Zellen/ml resuspendiert. Die Zellen wurden zu je 1 ml in Kryoröhrchen aliquotiert. Zum schonenden Einfrieren wurden die Röhrchen zunächst für 2 h auf -20 °C eingefroren, anschließend für 16 h auf -70 °C gelagert und danach in flüssigem Stickstoff aufbewahrt.

2.2.3.2. Transfektion von Sf9-Zellen mit DNA für transiente Proteinexpression durch Lipofektion

Für die Transfektion wurde nach Möglichkeit Plasmid-DNA verwendet, welche mit dem UltraMobiust-Kit (Novagen) (2.2.5.1.2) endotoxinfrei aufgereinigt wurde, da Endotoxine (Lipopolysaccharide der Zellwand von *E. coli*) die Transfektionseffizienz erheblich senken.

2.2.3.2.1. Vorgehensweise für 24-Well-Platte

Exponentiell wachsende Sf9-Zellen einer Monolayer- oder Suspensionskultur wurden mit vorgewärmtem Medium auf 4×10^5 Zellen/ml verdünnt. Eine Stunde vor der Transfektion wurden 0,5 ml (2×10^5 Zellen) pro Well in eine sterile 24-Well-Platte (mit Deckel) gegeben. Je Well wurde wie folgt vorgegangen:

0,4 µg der entsprechenden Plasmid-DNA (2.1.5) sowie 2 µl Insect GeneJuice Transfektionsreagenz (Novagen) wurden mit jeweils 20 µl serumfreiem Medium gemischt. Anschließend wurde die so erhaltene DNA-Lösung unter leichtem vortexen tropfenweise in die GeneJuice-Lösung geben, um ein Ausfallen der DNA zu vermeiden. Die GeneJuice/DNA-Mischung (Transfektionsmix) wurde 15 min bei

Raumtemperatur inkubiert. Daraufhin wurden 160 µl serumfreies Medium zum Transfektionsmix gegeben. Das Medium über den Zellen wurde abpipettiert und sofort der Transfektionsmix zugegeben, um ein Austrocknen des Wells zu verhindern. Der Deckel der Well-Platte wurde geschlossen und die Zellen bei 27 °C inkubiert. Nach 48 h wurden die Zellen geerntet und lysiert (2.2.3.7).

2.2.3.2.2. Vorgehensweise für 10 ml Suspensionskultur

In einem 125 ml Erlenmeyer-Kolben wurden 1×10^7 Sf9-Zellen in 8 ml serumfreiem Medium ausgesäht. 20 µg der entsprechenden Plasmid-DNA (2.1.5) sowie 100 µl Insect GeneJuice wurden mit jeweils 1 ml serumfreiem Medium gemischt. Anschließend wurde die so erhaltene DNA-Lösung unter leichtem vortexen tropfenweise in die GeneJuice-Lösung geben, um ein Ausfallen der DNA zu vermeiden. Die GeneJuice/DNA-Mischung wurde 15 min bei Raumtemperatur inkubiert. Der Transfektionsmix wurde zu den Zellen gegeben und diese bei 27 °C und 150 geschüttelt. Nach 48 h wurden die Zellen geerntet und lysiert (2.2.3.7).

2.2.3.3. Transfektion von Sf9-Zellen mit DNA für transiente Proteinexpression durch Calciumchlorid

2xHBS-Puffer: 40 mM HEPES; 1,7 mM Na₂HPO₄; 274 mM NaCl; 10 mM KCl; pH 7 mit NaOH

Exponentiell wachsende Sf9-Zellen einer Monolayerkultur wurden mit vorgewärmtem Medium auf 4×10^5 Zellen/ml verdünnt. Eine Stunde vor der Transfektion wurden 0,5 ml (2×10^5 Zellen) pro Well in eine sterile 24-Well-Platte (mit Deckel) gegeben. Je Well wurde wie folgt vorgegangen:

Zunächst wurden 0,4 µg des Plasmids pIEx_H10_eGFP in Millipore-Wasser gelöst und auf 250 mM CaCl₂ eingestellt. Anschließend wurden zur Präzipitatbildung 1,1 Volumen 2xHBS-Puffer pH 7 tropfenweise zugegeben und 20 min bei RT inkubiert. Danach wurde das Medium über den Zellen abgenommen, durch frisches serumfreies Medium ersetzt und das Präzipitat vorsichtig auf die Zellen gegeben. Nach 5 h Inkubation bei 27°C wurde das Kulturmedium abgenommen, um das Präzipitat von den Zellen zu entfernen. Anschließend wurde ein Glycerin-Schock durchgeführt: Hierzu wurden die Zellen für 1 min mit 25 % Glycerin (in PBS) inkubiert, bevor durch dreimaliges Waschen mit PBS Glycerinreste entfernt wurden. Anschließend wurden die Zellen in frischem serumfreiem Medium weiterkultiviert. Über einen Zeitraum von 12-72 h wurden die Zellen mikroskopisch auf die Expression von H10_eGFP überprüft.

2.2.3.4. Transfektion von Sf9-Zellen zur Generierung rekombinanter Baculoviren

Zur Generierung der rekombinanten Baculoviren wurde das BacMagic™DNA-Kit von Novagen (Darmstadt) verwendet. Hierzu wurden Sf9 Insektenzellen mit der Transferplasmid-DNA (enthält Target-Sequenz) und der BacMagic-Baculovirus-DNA (Novagen) cotransfiziert. Homologe Rekombination zwischen den beiden DNA-Molekülen resultiert in einem Baculovirus-Genom mit dem Promotor und der Target-Sequenz des Transfer-Plasmids. Die Rekombination stellt außerdem die Funktion des essentiellen viralen ORF1629 wieder her. Hierdurch erhält der rekombinante Baculovirus die Möglichkeit sich zu replizieren und eine Population von rekombinantem Baculoviren zu produzieren, welche ins Medium entlassen werden. In einer 24-Well-Platte wurden Zellen mindestens 1h vor der Transfektion zu $0,2 \times 10^6$ Zellen/Well in 2 ml BacVector Insektenzellmedium ausgesäht. Anschließend wurden die Zellen bis zu einer Konfluenz von 50 - 60% bei 27 °C inkubiert. Während der Inkubationszeit wurde der Co-Transfektions-Mix für jedes Well wie folgt in einem sterilen 1,5 ml - Eppendorfgefäß vorbereitet: Zu 200 µl BacVector Insektenzellmedium wurden 1 - 3 µl Insect GeneJuice Transfektionsreagenz, 1 µl BacMagic DNA sowie 800 ng Transfer-Vektor (2.1.5) gegeben. Sofort nach Zugabe des GeneJuice-Reagenzes wurde der Transfektionsmix durch vortexen gemischt, um ein Ausfallen der DNA zu vermeiden. Anschließend wurde der Transfektionsmix für 15 - 30 min bei Raumtemperatur inkubiert. Als Positivkontrolle für die Transfektion wurden 500 ng TX-Kontrollplasmid anstelle des rekombinanten Transfervektors zur Transfektion eingesetzt (β-Glucuronidase-Test, siehe unten). Als Negativkontrolle diente ein Transfektionsansatz ohne DNA. Das Medium über den zu transfizierenden Zellen wurde abgezogen und der Transfektionsmix sofort tropfenweise in die Mitte des Wells zugeben, um ein Austrocknen der Zellen zu vermeiden. Nach einer Inkubation bei 27 °C über Nacht wurden je Ansatz 200 µl BacVector Insektenzellmedium zugegeben. Zur initialen Amplifikation der Viren wurden die Zellen weitere 3 - 5 Tage bei 27 °C inkubiert. Anschließend wurde der den Virus enthaltende Überstand geerntet, abzentrifugiert (5 min, 1200 rpm) und in ein frisches steriles Gefäß überführt. Der Virus-Stock wurde bei 4 °C gelagert.

β-Glucuronidase-Test für erfolgreiche Transfektion:

Als Positivkontrolle für eine erfolgreiche Transfektion wurde ein *gus*-enthaltendes Transferplasmid (TX-Kontrollplasmid von Novagen; siehe oben) verwendet. Hierdurch kann zur Detektion des rekombinanten Virus die Expression der β-Glucuronidase bestimmt werden.

Hierfür wurden 3 - 5 Tage nach der Transfektion 100 µl des Mediums aus dem entsprechenden Well entnommen und mit 5 µl X-Gluc (20 mg/ml) versetzt. Anschließend wurde über Nacht bei Raumtemperatur inkubiert. Enthält das Medium rekombinante *gus*-enthaltenden Viren, so wird die β-Glucuronidase (*gus*) exprimiert. Diese spaltet das X-Gluc zu der farblosen Glucuronsäure und dem intensiv blauen 5-Brom-4-chlor-indoxyl und das Medium färbt sich blau.

2.2.3.5. Amplifikation rekombinanter Baculoviren

Für die erste Amplifikation wurden 1×10^6 Zellen in 35 mm-Zellkulturschälchen oder einem Well einer 6-Well-Platte ausgesäht. Die Zellen wurden bis zu einer Konfluenz von 50 - 60% bei 27 °C inkubiert. Anschließend wurde das Medium abgenommen, der gesamte Virus enthaltende Überstand der Co-Transfektion auf die Zellen gegeben und unter mehrmaligem Schwenken 1h bei Raumtemperatur inkubiert. Nach Ende der Inkubation wurden 2 ml Medium zugeben und die Zellen 4 - 5 Tage bei 27 °C inkubiert. Daraufhin wurde der Überstand abgenommen und die Zelltrümmer abzentrifugiert (5 min, 1200 rpm). Der so erhaltene Virus-Stock wurde entweder sofort zur weiteren Amplifikation verwendet oder bei 4 °C gelagert.

Für die zweite Amplifikation wurden $2 - 3 \times 10^6$ Zellen in einer 25 cm²-Zellkulturflasche ausgesäht. Die Zellen wurden bis zu einer Konfluenz von 50 - 60% bei 27 °C inkubiert. Anschließend wurde das Medium abgenommen, der gesamte Überstand der 1. Amplifikation auf die Zellen gegeben und unter mehrmaligem Schwenken für 1h bei Raumtemperatur inkubiert. Nach Ende der Inkubation wurden 3 ml Medium zugeben und die Zellen bei 27 °C inkubiert. Nach 4 - 5 Tagen Inkubation wurde der Überstand abgenommen und die Zelltrümmer abzentrifugiert (5 min, 1200 rpm).

Für die dritte und alle folgenden Amplifikationen wurde verfahren wie bei der zweiten Amplifikation, nur dass hier jeweils nur 1 - 2 ml des Virus enthaltenden Überstandes auf die neuen Zellen gegeben wurde. In dieser Arbeit wurde die Erfahrung gemacht, dass ein Baculovirus-Titer, welcher zur effektiven Expression von Protein ausreicht, nach ca. 3 - 4 Amplifikationszyklen des Virus erreicht ist.

2.2.3.6. Kultivierung von *HiV*-Insektenzellen

Die Kultivierung der *HiV*-Zellen erfolgte bei 27 °C in 75 cm² und 175 cm² TC-Flaschen mit TC100-Medium (Bio Whittaker), welches mit 10 % fötalem Kälberserum (FCS) komplementiert wurde. Die Medien wurden stets auf 27 °C vorgewärmt. Zur Subkultivierung wurde zunächst das alte Medium abgesaugt und durch frisches Medium ersetzt. Die Zellen wurden durch Abschlagen vom Flaschenboden abgelöst. Anschließend wurden sie in einer Verdünnung von 1:3 bis 1:5 in neue Kulturflaschen aufgeteilt und bei 27 °C weiter kultiviert.

2.2.3.7. Infektion von *HiV*-Insektenzellen mit Baculoviren zur Proteinexpression

Zunächst wurde eine Testexpression durchgeführt, um Aufschluss über die für einen Nachweis von MCM8 bzw. CDC45 erforderliche Virusmenge zu erhalten. Für die Testexpression wurden *HiV*-Insektenzellen in 25 cm² TC-Flaschen ausgesäht und bis zu einer Konfluenz von 70 % bei 27 °C inkubiert. Anschließend wurde das alte Medium abgenommen und durch 2 ml neues TC100 Medium ersetzt. Die Infektion erfolgte je Flasche mit 30 µl, 100 µl und 300 µl des Baculovirus. Die Flaschen wurden alle 20 Minuten geschwenkt, um eine gute Virusverteilung zu gewährleisten. Nach 1 h erfolgte

die Zugabe von 3 ml Medium. Die Expression erfolgte über 48 h bei 27 °C. Parallel dazu wurde eine Kontrollflasche ohne Virusbehandlung mitgeführt. Nach 2 Tagen erfolgte die Ernte durch abschlagen der adhärennten Zellen vom Flaschenboden. Die Zellsuspension wurde in ein Reaktionsgefäß überführt und die Zellen durch Zentrifugation (10 min, 500 g) sedimentiert. Anschließend wurden die Zellen mit 10 ml PBS (2.2.4.2) gewaschen und wie oben zentrifugiert. Das Zellsediment wurde aufgeschlossen (2.2.3.7.) und die Proteinexpression per SDS-PAGE analysiert. Effiziente Baculovirenstocks wurden zur präparativen Proteinexpression in 175 cm²-Flaschen verwendet. Hierzu wurden 0,5 - 3 ml des jeweiligen Virusstocks eingesetzt. Weiter wurde analog der Testexpression vorgegangen. Das Zellsediment nach Ernte der Zellen wurde für die Proteinaufreinigung verwendet.

2.2.3.8. Lyse von Insektenzellen

Lysepuffer: 50-150 mM Tris-HCl bzw. Tris-Ac pH 8,0; 50-150 mM NaCl bzw. KAc; 10 % Glycerin; 0,5 % Nonidet P-40; 5 mM β -Mercaptoethanol; 1x Complete EDTA-free Protease Inhibitor

Zur Lyse von Insektenzellen aus Kulturvolumina bis zu 10 ml wurden 5% des Kulturvolumens Insect PopCulture-Reagenz (Novagen) und 0,4 μ l (10 U) Benzonase Nuclease pro 1 ml des Original-Kulturvolumens zu den Zellen geben. Die Suspension wurde durch mehrmaliges Invertieren gemischt und 15 min bei RT inkubiert. Die Expression rekombinanter Proteine wurde per SDS-PAGE und Western-Blot (2.2.7.4.2) überprüft. Zur Lyse von Zellen aus Kulturvolumina > 10 ml wurden die Zellen durch zunächst durch Zentrifugation sedimentiert (10 min, 500 g). Das Sediment wurde in einem Sedimentvolumen Lysepuffer resuspendiert und der Zellaufschluss durch 30 - 60-minütige Inkubation auf Eis durchgeführt. 30 μ l des Gesamtzellextraktes wurde mit 10 μ l Proteinauftragepuffer (2.2.7.2/3) versetzt und für 5 min bei 95 °C erhitzt. Mittels Zentrifugation (13 000 g, 10 min) wurden die Zelltrümmer von der löslichen Fraktion getrennt. Der Überstand wurde in ein neues Gefäß überführt und die Zelltrümmer ebenfalls zur Analyse mit Proteinauftragepuffer (2.2.7.2/3) versetzt. Zur Überprüfung der Proteinexpression wurden die Proben per SDS-PAGE analysiert. Die gewonnenen Zellextrakte wurden entweder sofort weiter verwendet oder bis zur weiteren Verwendung in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80 °C gelagert.

2.2.4. Methoden im Umgang mit HeLa-Zellen

2.2.4.1. Auftauen

Kryoröhrchen mit gefrorenen Zellen wurden unter leichtem Schwenken in einem Wasserbad (37 °C) vollständig aufgetaut. Anschließend wurden die Zellen in ein steriles 50 ml Reaktionsgefäß überführt. Tropfenweise wurden 5 ml vorgewärmtes TC100-Medium + 10% FCS zugegeben und durch vorsichtiges auf- und abpipettieren gemischt. Nach Zentrifugation (2 min, 220 g) wurde das Zellsediment in 5 ml frischem Medium aufgenommen und zur Weiterkultivierung in eine 25 cm² TC-Flasche überführt. Für optimale Wachstumsbedingungen wurde das Medium am nächsten Tag gewechselt.

2.2.4.2. Kultivierung

PBS: 10 mM Na₂HPO₄; 1,8 mM KH₂PO₄; 140 mM NaCl; 2,7 mM KCl; pH 7,4

Die Kultivierung von humanen adhärenenten Zellen erfolgte als Monolayer bei 37 °C, 95 % Luftfeuchte und 5 - bzw. 10 %iger CO₂-Atmosphäre in beschichteten 25 cm², 75 cm² oder 175 cm² TC-Flaschen in DMEM (*Dulbeccos modified Eagle Medium*). Dieses wurde mit 1 % L-Glutamin sowie 10 % fötalem Kälberserum (FCS) komplementiert, welches vor Benutzung bei 56 °C für 30 min hitzeinaktiviert wurde. Die Medien wurden stets auf 37 °C vorgewärmt. Vor jeder Behandlung wurden die Zellen mikroskopisch auf ihre Wachstumsdichte und mögliche Kontaminationen überprüft. Zum Passagieren der Zellen wurde zunächst das alte Medium abgesaugt und die Zellen mit PBS + 10 mM EDTA pH 8,0 gewaschen. Im Anschluss wurde Trypsin in einer finalen Konzentration von 0,25% zugegeben und max. 5 min inkubiert. Trypsin bewirkt die proteolytische Degradation der zellulären Adhäsionsproteine, so dass sich die Zellen vom Untergrund ablösen. Die Trypsinwirkung wurde durch die Zugabe von frischem Medium inhibiert. Anschließend wurden die Zellen in einer Verdünnung von 1:2 bis 1:5 in neue Kulturflaschen aufgeteilt und bei 37 °C weiter kultiviert.

2.2.4.3. Synchronisation von HeLa-Zellen

HeLa-Zellen zeigen eine charakteristische Verteilung in den einzelnen Zellzyklusphasen. Bei logarithmisch wachsenden Zellen befinden sich lediglich 10 - 20 % in der S-Phase, während der größte Teil in der G1-Phase vorliegt. Um Analysen über Vorgänge während der Replikation vornehmen zu können, ist eine Anreicherung der Zellen in der S-Phase erforderlich. Dies wurde durch den Einsatz der Reagenzien Mimosin und Thymidin erreicht.

2.2.4.3.1. Mimosin-Block

Mimosin (β -N-[3-hydroxy-4-pyridon]- α -amino-propionsäure) stammt aus der Pflanzenart *Mimosaceae* und verursacht einen reversiblen Arrest am G1/S-Phase-Übergang. Ob der Arrest in der späten G1-Phase oder in der frühen S-Phase stattfindet, hängt von der eingesetzten Konzentration an Mimosin ab (Krude, 1999). Der genaue Wirkmechanismus von Mimosin ist noch weitgehend unklar (Hughes & Cook, 1996; Kalejta & Hamlin, 1997). Die bisher bekannten Zielstrukturen sind die Thymidin-Kinase (Lalande, 1990), die Ribonukleotid-Reduktase (Dai *et al.*, 1994), der CDK-inhibitor p27^{Kip1} (Wang *et al.*, 2000), die Initiationsfaktor-Untereinheit EIF3 p70 (Dong & Zhang, 2003) sowie die Serin-Hydroxymethyl-Transferase (Lin *et al.*, 1996). Da Mimosin in Lösung nicht stabil ist, wurde vor jedem Versuch eine 5 mM Mimosin-Stammlösung frisch angesetzt und steril filtriert.

Zur Vorbereitung der Synchronisation wurden HeLa-Zellen in je drei Petrischalen (\varnothing 10 cm) ausgesät und über Nacht bei 37 °C bis zu einer Konfluenz von 90 % kultiviert. Am folgenden Tag wurde das alte Medium abgesaugt und durch 9 ml frisches DMEM ersetzt, welches mit Mimosin in einer Endkonzentration von 0,5 mM supplementiert wurde. Nach einer Inkubation von 16 h bei 37 °C wurden die HeLa-Zellen durch zweimal 5 min Waschen mit Medium ohne Zusätze aus dem Mimosinarrest entlassen. Anschließend wurden die Zellen durch Trypsinierung (2.2.4.2) von der Oberfläche gelöst und in 5 ml PBS (2.2.4.2) resuspendiert. In einem 50 ml Reaktionsgefäß wurden die Zellen aus drei Petrischalen vereinigt, durch Zentrifugation (500 g, 5 min, 4 °C) sedimentiert und weitere zwei Mal mit PBS gewaschen. Vor dem dritten Zentrifugationsschritt (500 g, 5 min, 4 °C) wurden 1/10 der Suspension entnommen und in ein 15 ml Reaktionsgefäß überführt. Diese Probe wurde für die durchflusszytometrische Analyse der Zellen aufbewahrt (2.2.4.5). Die restlichen Zellen wurden für die Herstellung von Zellextrakten verwendet (2.2.4.4).

2.2.4.3.2. Thymidin-Block

Thymidin (Thymidindesoxyribose, TdR) wird zur Synchronisation von HeLa-Zellen in der S-Phase eingesetzt. Durch die Behandlung mit Thymidin wird die Ribonukleotid-Reduktase gehemmt, welche die Umwandlung der Ribonukleotide in Desoxyribonukleotide katalysiert. Durch die Blockierung der Ribonukleotid-Reduktase wird die DNA-Synthese gehemmt und die Zellen am Übergang der G1/S-Phase arretiert (Bjursell & Reichard, 1973). Zellen, die sich in der G2-, M- und G1-Phase befinden, sind davon nicht betroffen und durchlaufen den Zellzyklus, bis sie den G1/S-Übergang erreichen. Für die Versuche wurde eine 200 mM Thymidin-Stammlösung hergestellt und steril filtriert. Die Lösung wurde auf 4 °C aufbewahrt.

Zur Vorbereitung der Synchronisation wurden HeLa-Zellen in fünf mal drei Petrischalen (\varnothing 10 cm) ausgesät und für 24 h bei 37 °C kultiviert. Anschließend wurde ein Thymidin-Doppelblock durchgeführt (Bootsma *et al.*, 1964; Bostock *et al.*, 1971). Hierfür wurde das alte Medium abgesaugt und durch 9,75 ml frisches DMEM ersetzt, welches mit Thymidin in einer Endkonzentration von 5 mM supplementiert wurde. Drei Petrischalen blieben als logarithmische Kontrolle unbehandelt. Nach einer Inkubation von 16 h bei 37 °C wurden die HeLa-Zellen zweimal 5 min mit Medium ohne Zusätze gewaschen. Dadurch wurde der erste Thymidinblock aufgehoben. Nach Zugabe von 9,75 ml Medium

mit FCS je Petrischale wurden die Zellen für weitere 8 h bei 37 °C kultiviert. Danach wurde durch die Zugabe von Thymidin (5 mM Endkonzentration) je Petrischale der zweite Thymidin-Block eingeleitet. Die Kontroll-Petrischalen blieben weiterhin unbehandelt. Nach weiteren 16 h Inkubation wurde dieser Block analog des ersten Blocks aufgehoben. Nachdem durch Waschen das Thymidin vollständig von den Zellen entfernt wurde, erfolgte die Zugabe von 10 ml frischem Medium. Anschließend wurden die Zellen in thymidinfreiem DMEM weiterkultiviert und nach 0, 3, 6 bzw. 9 h geerntet. Als Zeitpunkt 0 galt das Entlassen der Zellen aus dem Thymidin-Doppelblock. Zu diesem Zeitpunkt wurden drei der thymidinbehandelten Petrischalen sowie die Kontrollen geerntet, die keine Thymidinbehandlung erhielten. Die Ernte der Zellen erfolgte durch Trypsinierung (2.2.4.2). Anschließend wurden die Zellen in PBS resuspendiert und in ein Reaktionsgefäß überführt. Die Zellen wurden zentrifugiert (500 g, 5 min, 4 °C) und weitere zweimal mit PBS (2.2.4.2) gewaschen. Vor dem dritten Zentrifugationsschritt (500 g, 5 min, 4 °C) wurden 1/10 der Suspension entnommen und in ein 15 ml Reaktionsgefäß überführt. Diese Probe wurde für die durchflusszytometrische Analyse der Zellen aufbewahrt (siehe 2.2.4.5). Die restlichen Zellen wurden für die Herstellung von Zellextrakten verwendet (siehe 2.2.4.4). Des Weiteren wurden je drei Petrischalen mit thymidinbehandelten Zellen zu den Zeitpunkten 3 h, 6 h und 9 h geerntet. Mit diesen Zellen wurde ebenso verfahren wie mit den Zellen von Zeitpunkt 0.

2.2.4.4. Herstellung von HeLa-Zellextrakten

2.2.4.4.1. Fraktionierte Zellextrakte

Puffer KM:	10 mM MOPS-NaOH pH 7,0; 1 mM MgCl ₂ ; 10 mM NaCl; 2 mM DTT;
Puffer KM+NP40:	10 mM MOPS-NaOH pH 7,0; 1 mM MgCl ₂ ; 10 mM NaCl; 2 mM DTT; 0,5% Nonidet P-40
Puffer KAc:	30 mM HEPES-KOH pH 7,8; 0,5 mM MgCl ₂ ; 5 mM KAc; 2mM DTT;
DNAseI-Puffer:	40 mM Tris-HCl, pH8.0; 6 mM MgCl ₂ ; 1.5 mM CaCl ₂ ; 0.5 mM DTT; 150 mM NaCl
Rest-Puffer:	20 mM HEPES-KOH pH 7,8; 1 mM EDTA (Nuklease-Stop); 0,5 mM DTT; 5 mM KCl; 2 M NaCl

25x Proteaseinhibitor-Stammlösung: 1 Tablette *Complete EDTA-free Protease Inhibitor Mix* (Roche) in 2 ml H₂O, auf -20°C gelagert

Zur Analyse der Chromatinbindung der Proteine aus synchronisierten HeLa-Zellen (2.2.4.3) wurden die cytosolischen Proteine, die löslichen Kernproteine und die chromatingebundenen Proteine getrennt präpariert. Hierfür wurde das Zellsediment der synchronisierten und gewaschenen HeLa-Zellen durch leichtes Auf- und Abpipettieren in 1 ml Puffer KM resuspendiert und zentrifugiert (300 g, 1 min, 4 °C). Anschließend wurde das Sediment in 750 µl Puffer KM+NP40 mit 30µl Proteaseinhibitor resuspendiert und für 30 min bei 4 °C invertiert. Hierdurch wurden die Zellmembran sowie die Kernmembran permeabilisiert. Im Anschluss wurden die Zelltrümmer durch Zentrifugation sedimentiert (500 g, 5 min, 4 °C). Der so erhaltene Überstand enthielt alle im Cytosol und im Nucleoplasma

enthaltenen löslichen Proteine. Bis zur weiteren Bearbeitung wurde diese Fraktion aliquotiert, in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80 °C gelagert. Das Sediment, welches das Chromatin mit den daran gebundenen Proteinen enthielt, wurde in 1,5 ml KAc-Puffer mit 60 µl Proteaseinhibitor gewaschen und zentrifugiert (500 g, 5 min, 4 °C). Zur Degradation des Chromatins wurde das Sediment in 750 µl DNaseI-Puffer mit 30 µl Proteaseinhibitor, 2 µl DNaseI (20 U/µl) und 3,8 µl RNaseA (10 mg/ml in TE) resuspendiert und für 15 min bei RT inkubiert. Anschließend wurden die Zelltrümmer durch Zentrifugation sedimentiert (20000g, 5 min, 4 °C). Der so erhaltene Überstand enthielt alle chromatingebundenen Proteine. Bis zur weiteren Bearbeitung wurde diese Fraktion aliquotiert, in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80 °C gelagert. Das Sediment wurde in 750µl Rest-Puffer resuspendiert, aliquotiert, in flüssigem Stickstoff schockgefroren und ebenfalls bei -80 °C gelagert.

2.2.4.4.2. Zellextrakte für die Immunopräzipitation von MCM8 und CDC45

Lysepuffer: 100 mM Tris-Ac pH 8; 200 mM KAc; 10% Glycerin; 1,5 mM MgAc₂;
0,1 % Nonidet P-40; 10 mM NaF; 2 mM Na₃VO₄; 1x Complete EDTA-free Protease
Inhibitor Mix

HeLa-Zellen wurden in Petrischalen (Ø 10 cm) ausgesät und über Nacht bei 37 °C inkubiert. Die Zellen wurden durch Trypsinierung (2.2.4.2) geerntet. Nach Zentrifugation (500 g, 5 min, 4 °C) wurden die Zellen zweimal mit PBS (2.2.4.2) gewaschen. Alle weiteren Schritte der Zellextraktion erfolgten bei 4 °C. Das Sediment wurde in 1 ml Lysepuffer resuspendiert. Dann wurden die Zellen durch 30 Züge mit dem Pistill „tight“ im *Dounce Homogenizer* aufgeschlossen und anschließend 15 min auf Eis inkubiert. Durch Zentrifugation (20 000 g, 10 min, 4 °C) wurden die Zelltrümmer sedimentiert und der Überstand aliquotiert, in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bis zur weiteren Verwendung bei -80 °C gelagert. Für einen Immunopräzipitationsansatz wurden die Zellen einer Petrischale verwendet.

2.2.4.5. Durchflusszytometrische Analyse von HeLa-Zellen (FACS-Analyse)

50x Propidiumjodid-Lösung:	2 mg/ml Propidiumjodid in 38 mM NaCitrat pH 6,8
RNase A-Lösung:	100 mg/ml
Propidiumjodid/RNase A-Lösung:	40 µg/ml Propidiumjodid (1:50-Verdünnung der 50x Lösung) + 250 µg/ml RNase A (1:400 Verdünnung der RNase A-Lösung in PBS (2.2.4.2))

Das *Fluorescence Activated Cell Sorting* (FACS-Analyse) ermöglicht eine Quantifizierung des Zellzyklus, indem der DNA-Gehalt nach Fluoreszenzmarkierung gemessen wird. Das Prinzip beruht darauf, dass Zellen Licht streuen bzw. emittieren, wenn sie einen Lichtstrahl passieren. In der Durchflusszytometrie werden nur das Vorwärtstreulicht (FCS - *Forward scatter*) und das Seitwärtstreulicht (SSC - *Sideward scatter*) gemessen. Das Vorwärtstreulicht ist ein Maß für die

Beugung des Lichtes und hängt vom Volumen der Zellen ab. Das Seitwärtsstreulicht ist ein Maß für die Brechung des Lichtes und ist abhängig von Zellgranularität sowie Größe und Struktur des Zellkerns. Je nach gemessener Fluoreszenzintensität im Zellsuspensions-Tropfen, die wiederum vom DNA-Gehalt und damit von der Zellzyklusphase abhängt, werden die Zellen den Zellzyklusphasen G0/G1, S und G2/M zugeordnet. Die Fluoreszenzmarkierung erfolgte mit Propidiumjodid (2,7-diamino-9-phenyl-10-(diethylaminopropyl)-phenantridiniodid, PI). PI dringt in die Zellen ein und interkaliert in die DNA-Doppelhelix, so dass das gemessene PI-Signal zum DNA-Gehalt proportional ist. Da sich PI auch in doppelsträngige RNA einlagert, wurde zusätzlich RNase A zugegeben. Nach der Zellernte wurden die Zellen mit PBS (2.2.4.2) gewaschen, noch einmal abzentrifugiert und in 0,5 ml PBS resuspendiert. Anschließend wurden unter vortexen tropfenweise 3 ml 99,8 % Ethanol hinzugegeben. Dies diente der Fixierung der Zellen sowie der Permeabilisierung für den Farbstoff PI. Die Proben wurden für mindestens 24 h bei -20 °C gelagert. Für die Analyse wurden die Zellen sedimentiert (500 g, 5 min, 4 °C) und mit PBS gewaschen. Das Zellsediment wurde in 1 ml einer frisch angesetzten Propidiumjodid/RNase A-Lösung aufgenommen und 30 min bei 37 °C im Dunkeln inkubiert. Anschließend wurde die durchflusszytometrische Analyse am FACS Calibur mit der dazugehörigen CellQuest Pro Software vorgenommen. Das Computerprogramm winmdi28 diente der quantitativen Auswertung mit Hilfe der Histogrammdarstellung. Um die Grenzen der einzelnen Zellzyklusphasen festzulegen, wurden logarithmisch wachsende Zellen verwendet.

2.2.5. Molekularbiologische Methoden

2.2.5.1. Klonierung

2.2.5.1.1. Polymerasekettenreaktion (PCR)

Mit Hilfe einer thermostabilen DNA-Polymerase (*Pfu* oder *Taq*) wird ein DNA-Fragment (Matrize) zwischen zwei definierten, an Strang und Gegenstrang hybridisierenden Oligonukleotiden vervielfältigt. Die Reaktionsfolge besteht aus wiederholter, hitzeinduzierter Trennung des DNA-Doppelstrangs, Oligonukleotid-Hybridisierung und zuletzt der DNA-Synthese. Je nach Oligonukleotid wurde eine entsprechende Hybridisierungstemperatur geschätzt.

PCR-Ansatz:

1 µmol 3'-Oligonukleotid
 1 µmol 5'-Oligonukleotid
 1x Pufferbedingungen entsprechend
 verwendeter Polymerase
 2 ng Matrizen-DNA
 200 µmol dNTPs
 1U entsprechender Polymerase

PCR-Lauf:

95 °C	5 min	} 25 - 35 Zyklen
95 °C	30 s	
45 - 56 °C	1 min	
72 °C	1-4 min	
72 °C	5 min	
4 °C		

Die PCR-Produkte wurden durch Sequenzierung auf Richtigkeit überprüft. Hierfür wurde die DNA zu MWG (Ebersberg) bzw. zu SRD (Bad Homburg) geschickt, wo die Sequenzierung nach der Didesoxykettenabbruchmethode (Sanger *et al.*, 1977) durchgeführt wurde.

2.2.5.1.2. Quickchange-Mutagenese

Die Quickchange-Mutagenese wurde in Anlehnung an das Protokoll von Stratagene (La Jolla, USA) durchgeführt, um Punktmutationen in das Gen von MCM8 einzuführen. Hierfür wurde als Template das Plasmid mit dem Zielgen und zur Mutagenese zwei komplementäre Primer eingesetzt, welche beide die gewünschte Veränderung der Gensequenz enthielten. Zur Verlängerung der Primer wurde die *Pfu* Polymerase, eine höhere Menge DNA-Matrize (ca. 25 ng) und eine geringere Anzahl von Zyklen (16) benutzt, um die Anzahl der Fehler im Produkt möglichst gering zu halten. Die Amplifizierung des kompletten Plasmids wurde durch Verwendung einer längeren Elongationszeit (7 - 9 min) gewährleistet. Anschließend wurde der PCR-Ansatz mit *DpnI* verdaut. *DpnI* schneidet seine Erkennungssequenz GATC nur, wenn das Adenosin methyliert vorliegt. In der neu generierten DNA ist dies nicht der Fall, so dass nur der parentale DNA-Strang verdaut wird. Mit der verbleibenden neusynthetisierte DNA wurde eine Transformation von *E. coli* XL1 Blue durchgeführt (2.2.1.4).

2.2.5.1.3. Spaltung mit Restriktionsenzymen

Die Restriktion von DNA mit Endonukleasen wurde in den vom Hersteller empfohlenen Puffersystemen durchgeführt. Die Menge an Enzym und die Inkubationsdauer richteten sich nach der eingesetzten DNA-Menge und der Anzahl der Schnittstellen im Plasmid. Das Gesamtvolumen des Restriktionsansatzes betrug mindestens das Zehnfache des Enzymvolumens. Die Inaktivierung der Enzyme wurde, falls möglich, nach Anleitung des Herstellers durchgeführt. Die Größe der erhaltenen DNA-Fragmente wurde in 0,8 – 3 %igen Agarosegelen kontrolliert und aus diesen mit Hilfe des QIAEX II Gel Extraction Kits (Qiagen) eluiert.

2.2.5.1.4. Enzymatische Dephosphorylierung

Um die Religation von linearisierten Vektoren mit kompatiblen Enden zu verhindern, wurden die Phosphatgruppen an deren 5'-Enden mit Antarktischer Phosphatase (NEB) abgespalten. Die Durchführung erfolgte nach Anleitung des Herstellers.

2.2.5.1.5. Ligation

DNA-Fragmente können mit Hilfe der T4-DNA-Ligase kovalent verknüpft werden, sofern die Enden kompatibel sind. In die Ligation wurden jeweils 50 - 100 ng Vektor mit Insert im molaren Verhältnis von 1:1 bis 1:6 eingesetzt. Die Ligationen wurden nach Anleitung des Herstellers (New England Biolabs, Frankfurt am Main) durchgeführt und 4 h bei 15 °C oder über Nacht bei 4 °C inkubiert.

2.2.5.2. Isolierung und Reinigung von DNA

2.2.5.2.1. Phenol-Chloroform-Extraktion von DNA

Um den Erfolg einer Ligation (2.2.5.1.5) zu überprüfen, wurde eine Phenol-Chloroform-Extraktion der DNA durchgeführt. Hierzu wurden 10 - 40 Klone von entsprechend transformierten *E. coli* XL1Blue-Zellen selektiert und in jeweils 750 µl LB-Medium mit den jeweiligen Antibiotika bei 37 °C über Nacht in einer 48-Well-Platte unter Schütteln inkubiert. Anschließend wurden 500 µl jeder Kultur entnommen und mit 500 µl Phenol:Chloroform:Isoamylalkohol (25:24:1) durch vortexen vermischt. Zur Trennung der Phenolphase von der wässrigen Phase (enthält die DNA) wurden die Proben bei 15000 g für 5 min zentrifugiert. Die obere wässrige Phase wurde abgenommen und die DNA mit 500 µl Isopropanol gefällt. Nach einer Zentrifugation bei 13000 g für 10 min wurde die Flüssigkeit vorsichtig abgezogen und die Sedimente mit 200 µl 70 % (v/v) Ethanol gewaschen. Anschließend wurden die Proben im Vakuum oder an der Luft getrocknet. Die trockenen Sedimente wurden in 20 µl TE-Puffer mit 10 µg/ml RNase A resuspendiert und mit den entsprechenden Restriktionsenzymen geschnitten.

2.2.5.2.2. Isolierung doppelsträngiger Plasmid-DNA mit Kit

Die Isolierung von Plasmid-DNA erfolgte über kommerziell erhältliche Silica-basierter Säulchen. Für kleinere Mengen wurde das Plasmid Miniprep Kit I, für größere Mengen das Plasmid Midiprep Kit I verwendet. Die DNA wurde jeweils nach Vorschrift des Herstellers (peqlab) gereinigt und mit je 50 - 300 µl H₂O_{Millipore} eluiert. Zur Isolierung endotoxinfreier Plasmid-DNA für die Transfektion von Insektenzellen wurde das UltraMobius-Kit verwendet. Die DNA wurde nach Vorschrift des Herstellers (Novagen) gereinigt. Nach der Isopropanolfällung wurde das Sediment in je 100 - 500 µl H₂O_{Millipore} gelöst. Die DNA-Menge wurde jeweils durch spektralphotometrische Messung der Nucleinsäurekonzentration (2.2.5.2.4) bestimmt.

2.2.5.2.3. Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarose-Gelen und PCR-Ansätzen

Die Elution von DNA-Fragmenten aus 0,8 - 3 %igen (w/v) Agarosegelen so wie die direkte Aufreinigung von PCR-Produkten wurde mittels dem Wizard® SV Gel- und PCR Clean-Up System durchgeführt. Die gewünschte DNA-Bande wurde mit einem sterilen Skalpell unter möglichst kurzzeitiger UV-Bestrahlung (366 nm) aus dem Gel ausgeschnitten und in ein Eppendorf-Reaktionsgefäß überführt. Anschließend wurde das Gelfragment nach Angaben des Herstellers (Promega) in Puffer gelöst. PCR-Ansätze wurden nach Angaben des Herstellers mit Puffer versetzt und direkt aufgereinigt. Die DNA-Aufreinigung über Anionenaustauscher-Säulchen erfolgte ebenfalls entsprechend der Anleitung des Herstellers. Im letzten Schritt wurde die DNA mit 50 µl H₂O_{Millipore} oder TE-Puffer eluiert. Die erhaltenen DNA-Fragmente wurden in 0,8 - 3 %igen Agarosegelen auf Konzentration und Reinheit überprüft.

2.2.5.2.4. Bestimmung der Konzentration von DNA

Die Konzentrationsbestimmung isolierter DNA wurde spektralphotometrisch bestimmt. Die DNA wurde entsprechend verdünnt und in einer Quarzküvette in einem Beckman DU640-Spektrophotometer vermessen. Es wurden die Extinktionen bei 260 und 280 nm aufgenommen. Die Konzentrationen wurde aus oD_{260} nach folgender Formel berechnet:

$$c[\mu g/ml] = oD_{260} \times \text{Verdünnungsfaktor} \times 50 \mu g/ml$$

Außerdem wurde das Verhältnis oD_{260}/oD_{280} berechnet, welches im besten Fall den Wert 2,0 aufweisen sollte.

2.2.6. Proteinbiochemische Methoden

2.2.6.1. Säulenchromatographie

2.2.6.1.1. Puffer

Protino-Ni-IDA/TED:	Puffer A: 50 mM Na-Phosphat pH 8,0; 300 mM NaCl Puffer B: wie Puffer A + 250 mM Imidazol Puffer C: wie Puffer A + 50 mM Imidazol
Talon:	Puffer A: 50 mM Na-Phosphat, pH 8,0, 300 mM NaCl, 10 % Glycerin Puffer B: wie Puffer A + 150 mM Imidazol Puffer C: wie Puffer A + 10 mM Imidazol Puffer D: wie Puffer A + 20 mM Imidazol Puffer E: wie Puffer A + 40 mM Imidazol
Ni-NTA:	Puffer A: 50 mM Na-Phosphat pH 8,0; 300 mM NaCl; 20% Glycerin Puffer B: wie Puffer A + 250 mM Imidazol Puffer C: wie Puffer A + 20 mM Imidazol Puffer D: wie Puffer A + 50 mM Imidazol
Strep-Tactin:	Puffer A: 100 mM Tris-HCl pH 8,0; 150 mM NaCl; 1 mM EDTA; 10 % Glycerin Puffer B: wie Puffer A + 2,5 mM Desthiobiotin
EMD SO₃⁻/DEAE/TMAE:	Puffer A: 25 mM Na-Phosphat; pH 5-9 durch H ₃ PO ₄ bzw. NaOH Puffer B: wie Puffer A + 1 M NaCl
S-Sepharose/Q-Sepharose:	Puffer A: 20 mM Tris-Ac pH 8; 2 mM DTT; 5 mM Mg(Ac) ₂ ; 0,5 mM MnSO ₄ ; 10% Glycerin Puffer B: wie Puffer A + 1 M KCl
EMD-Heparin:	Puffer A: 25 mM Na-Phosphat pH 5-8; 10 mM MgCl ₂ ; 1 mM EDTA; 1 mM 2-Mercaptoethanol; 10 % Glycerin Puffer B: wie Puffer A + 1 M NaCl
Hydroxylapatit:	Puffer A: 6 mM Na-Phosphat pH 6,8; 2 mM DTT; 5 mM Mg(Ac) ₂ ; 0,5 mM MnSO ₄ ; 10% Glycerin Puffer B: wie Puffer A + 500 mM Na-Phosphat pH 6,8

EMD-Propyl/Butyl-Sepharose: Puffer A: 20 mM Tris-Ac pH 8; 2 mM DTT; 5 mM Mg(Ac)₂;
0,5 mM MnSO₄; 10% Glycerin; 1,8 M (NH₄)₂SO₄
Puffer B: wie Puffer A ohne (NH₄)₂SO₄

2.2.6.1.2. Analytische Mini-Chromatographie

Um eine geeignete Chromatographiematrix zur Aufreinigung von MCM8 zu ermitteln, wurden verschiedene Säulenmaterialien getestet. Für den ersten Aufreinigungsschritt wurden die Affinitätschromatographiematerialien Protino-Ni-IDA, Protino-Ni-TED, Ni-NTA, Talon und Strep-Tactin verwendet. Hierfür wurden Mobicols Chromatographiesäulchen (Mo Bi Tec GmbH, Göttingen) mit 300 µl Säulenmaterial befüllt und mit 5 ml Puffer A äquilibriert. Der Zellextrakt wurde mit NaCl und NaOH auf die Bedingungen der Chromatographie eingestellt. Anschließend wurden 0,5 - 2 ml des Zellextraktes (2.2.1.6, 2.2.3.7) mit einer Flussrate von ca. 1 ml/min auf die Säule aufgetragen. Der Durchbruch wurde aufgefangen und zur weiteren Analyse aufbewahrt. Danach wurde die Säule mit 1,5 ml Puffer A gewaschen, der Durchfluss aufgefangen und zur weiteren Analyse aufbewahrt. Das Protein wurde dreimal mit 200 µl Puffer B von der Säule eluiert und die Eluate 1 bis 3 aufgefangen. Die Proben wurden per SDS-PAGE analysiert. Von den so getesteten Materialien wurden alle bis auf Protino-Ni-TED in der präparativen Chromatographie verwendet.

Zur weiteren Aufreinigung und Konzentrierung des im ersten Aufreinigungsschritt gewonnenen Proteins wurden die Ionentauscher Fractogel EMD SO₃, Fractogel EMD DEAE und Fractogel EMD TMAE sowie Fractogel EMD-Heparin, Fractogel EMD Propyl, Butyl-Sepharose und Hydroxylapatit getestet. Hierfür wurden nach der Affinitäts-Aufreinigung 0,5 - 2 ml der Peakfraktion auf ein Chromatographiesäulchen aufgetragen. Alle weiteren Schritte wurden analog dem Test der Affinitätschromatographiematerialien durchgeführt. Zum Einsatz in der präparativen Chromatographie kamen EMD-SO₃⁻, EMD-DEAE und Heparin.

2.2.6.1.3. Präparative Affinitätschromatographie

Ni-NTA Mini-Aufreinigung

Ni-NTA wurde verwendet, um Varianten von MCM8 mit His-Tag nach der Expression in Insektenzellen aufzureinigen. Die Vorgehensweise war analog zur analytischen Ni-NTA Mini-Aufreinigung (2.2.6.1.2). Vor der Elution wurde hier zusätzlich mit je 1,5 ml Puffer C und D unspezifisch gebundenes Protein von der Säule gewaschen.

StrepTactin Mini-Aufreinigung

Strep-Tactin wurde verwendet, um Varianten von MCM8 mit Strep-Tag nach der Expression in Insektenzellen aufzureinigen. Die Vorgehensweise war analog zur analytischen StrepTactin Mini-Aufreinigung (2.2.6.1.2).

Talon Mini-Aufreinigung

Puffer A: 50 mM Tris-Ac pH 8; 150 mM KAc; 1,5 mM MgAc₂; 1 mM 2-Mercaptoethanol;

10 % Glycerin; 10 mM NaF; 2 mM Na₃VO₄

Puffer B: wie Puffer A + 150 mM Imidazol

Puffer C: wie Puffer A + 10 mM Imidazol

Puffer D: wie Puffer A + 20 mM Imidazol

Puffer E: wie Puffer A + 40 mM Imidazol

Die präparative Talon Mini-Aufreinigung wurde verwendet, um Varianten von MCM8 mit His-Tag nach der Expression in Insektenzellen aufzureinigen. Die Vorgehensweise war analog zur analytischen Talon Mini-Aufreinigung (2.2.6.1.2). Vor der Elution wurde hier zusätzlich mit je 1,5 ml Puffer C, D und E unspezifisch gebundenes Protein von der Säule gewaschen.

Talon 10 ml Tropfsäule

Talon wurde verwendet, um Varianten von MCM8 mit His-Tag nach der Expression in *E. coli* aufzureinigen. Der Zelleextrakt (2.2.1.6) wurde auf 300 mM NaCl und pH 8 (mit NaOH) eingestellt und durch einen 0,22 µm Filter passiert. Anschließend wurde der Extrakt mit Hilfe einer Peristaltikpumpe (GE Healthcare) mit einer Flussgeschwindigkeit von 0,5 ml/min auf eine mit Puffer A (2.2.6.1.1) äquilibrierte Talon-Säule aufgegeben. Nach dem Auftragen der Probe wurde die Säule zunächst mit Puffer A bis zum Erreichen der Basislinie gewaschen. Anschließend wurde sukzessiv mit je drei Säulenvolumina der Waschpuffer C - E unspezifisch gebundenes Protein von der Säule gewaschen. Die Elution des gebundenen Proteins mit Puffer B erfolgte anschließend bei einer Flussgeschwindigkeit von 1 ml/min. Mit Hilfe eines Durchflussspektrometers (LKB 2238 Uvicord SII, Pharmacia) wurde die Absorption des eluierten Proteins bei 280 nm gemessen und aufgezeichnet. Das Eluat wurde in Fraktionen von 5 ml aufgefangen. Die Proben wurden per SDS-PAGE analysiert.

Protino-Ni-IDA 10 ml Tropfsäule

Protino-Ni-IDA wurde verwendet, um His-getaggte Varianten von MCM8 aus *E. coli*-Zellextrakten aufzureinigen. Der Zelleextrakt (2.2.1.6) wurde auf 300 mM NaCl und pH8 (mit NaOH) eingestellt und durch einen 0,22 µm Filter passiert. Anschließend wurde der Extrakt mit Hilfe einer Peristaltikpumpe (GE Healthcare) mit einer Flussgeschwindigkeit von 0,5 ml/min auf eine mit Puffer A (2.2.6.1.1) äquilibrierte Protino-Ni-IDA-Säule aufgegeben. Nach dem Auftragen der Probe wurde die Säule mit Zunächst mit Puffer A bis zum Erreichen der Basislinie gewaschen. Anschließend wurde mit Puffer C unspezifisch gebundenes Protein von der Säule gewaschen. Die Elution des gebundenen Proteins mit Puffer B (2.2.6.1.1) erfolgte anschließend bei einer Flussgeschwindigkeit von 1 ml/min. Mit Hilfe eines Durchflussspektrometers (LKB 2238 Uvicord SII, Pharmacia) wurde die Absorption des eluierten Proteins bei 280 nm gemessen und aufgezeichnet. Das Eluat wurde in Fraktionen von 5 ml

aufgefangen. Die Proben wurden per SDS-PAGE analysiert. Zur denaturierenden Aufreinigung wurde den Puffern jeweils 8 M Harnstoff zugesetzt.

2.2.6.1.4. FPLC-gestützte Heparin-Chromatographie

Um die aus *E. coli* über Protino-Ni-IDA bzw. Talon (2.2.6.1.3) gereinigten Varianten von MCM8 in einem zweiten Schritt weiter zu reinigen und zu konzentrieren, wurde zum Teil die Heparin-Chromatographie verwendet. Die Chromatographie wurde an einem FPLC-Gerät (Pharmacia, Freiburg) durchgeführt. Die Aufreinigung wurde bei pH 6 durchgeführt, da unter diesen Bedingungen das meiste MCM8 an das Chromatographiematerial adsorbiert. Die EMD Heparin-Säule (Merck, Darmstadt) wurde mit 10% Puffer B äquilibriert. Die MCM8-haltigen Fraktionen nach der Protino-Ni-IDA- bzw. Talon-Aufreinigung wurden mit Puffer A (2.2.6.1.1) auf 100 mM NaCl verdünnt und mit einer Flussgeschwindigkeit von 1 ml/min auf die EMD-Heparin Säule gegeben. Der Durchbruch wurde in einem 50 ml-Reaktionsgefäß gesammelt. Anschließend wurde die Säule mit 5 Säulenvolumen 10% Puffer B (2.2.6.1.1) gewaschen und der Durchfluss in einem 50 ml Reaktionsgefäß gesammelt. Die Elution der MCM8-Varianten erfolgte über einen Gradienten von 100 bis 1000 mM NaCl mit einer Flussgeschwindigkeit von 1ml/min. Mit Hilfe eines Durchflussspektrometers (LKB 2238 Uvicord SII, Pharmacia) wurde die Absorption des eluierten Proteins bei 280 nm gemessen und aufgezeichnet. Das Eluat wurde in Fraktionen von 1 ml aufgefangen. Die Proben wurden per SDS-PAGE analysiert.

2.2.6.1.5. Ionenaustauschchromatographie

FPLC-gestützte EMD-SO₃⁻-Chromatographie

Zum Teil wurden die aus *E. coli* über Protino-Ni-IDA (2.2.6.1.2) gereinigten Varianten von MCM8 als zweiten Schritt mit einer EMD-SO₃⁻- Kationenaustauscherchromatographie gereinigt und aufkonzentriert. Die Aufreinigung wurde bei pH 7 durchgeführt. Unter diesen Bedingungen ist die Ladung von MCM8 entsprechend seines Isoelektrischen Punktes (bestimmt mit Vector-NTI) positiv, was eine Bindung an EMD-SO₃⁻ ermöglicht. Die weitere Vorgehensweise war analog zur Heparin-Chromatographie (2.2.6.1.4). Zur denaturierenden Aufreinigung wurde den Puffern (2.2.6.1.1) jeweils 8 M Harnstoff zugesetzt.

Präparative DEAE-Miniaufreinigung

Puffer A: 50 mM Tris-HCl pH8; 50 mM NaCl; 1mM 2-Mercaptoethanol; 10 % Glycerin

Puffer B: wie Puffer A + 100 mM NaCl

Puffer C: wie Puffer A + 200 mM NaCl

Puffer D: wie Puffer A + 300 mM NaCl

Puffer E: wie Puffer A + 500 mM NaCl

Puffer F: wie Puffer A + 700 mM NaCl

Durch DEAE-Chromatographie wurden aus einer Co-Expression MCM8-Varianten und CDC45 aus *HIV*-Zellextrakten aufgereinigt. Die Vorgehensweise war analog zur analytischen DEAE Mini-Aufreinigung (2.2.6.1.2). Hier wurden die Proteine mit steigender Konzentration von NaCl von der Säule eluiert.

2.2.6.2. Gelfiltration

Gelfiltrationspuffer: 20 mM Tris-HCl pH 8,0; 150 mM NaCl; 10% Glycerin

Die Gelfiltration diente der Analyse der möglichen Interaktion von MCM8 und CDC45. Sie wurde mit einer Superose12-Säule (Pharmacia) durchgeführt. Für die Gelfiltration wurden Zellextrakte aus *HIV*-Zellen, in denen MCM8 und CDC45 co-exprimiert wurden, über DEAE-Chromatographie (2.2.6.1.5) aufgereinigt. Fraktionen, in denen MCM8 zusammen mit CDC45 eluierte, wurden vereinigt und über Nacht in Slide-a-Lyzer Dialysekassetten (Thermo) gegen den Gelfiltrationspuffer dialysiert. Nach Auftrag der Probe auf die Gelfiltrationssäule erfolgte die Chromatographie bei einer Flussrate von 0,2 ml/min. Der Durchfluss wurde in 1 ml-Fractionen aufgefangen und mit Proteinauftragepuffer (2.2.7.2/3) versetzt. Die Proben wurden per SDS-PAGE analysiert. Um die Größe der eluierten Proteine bzw. Proteinkomplexe anhand des Elutionsprofils abschätzen zu können, wurde die Gelfiltration separat mit einem Molekulargewichtsstandard aus Chymotrypsin (25 kDa) BSA (67 kDa und ~130 kDa BSA-Dimer) und Catalase (240 kDa) durchgeführt.

2.2.6.3. Ultrafiltration zur Konzentrierung von Proteinen

Zum Anreichern des Zielproteins wurden die Fraktionen des aufgereinigten Proteins vereinigt und über Ultrafiltrationssäulen (Vivaspin 500, Sartorius Stedim Biotech) mit einem MWCO (*Molecular Weight Cut Off*) von 10 kDa zentrifugiert. Hierbei wurde, wenn nötig, ein Pufferwechsel durchgeführt. Es wurde nach Angabe des Herstellers verfahren.

2.2.6.4. Dialyse von Proteinen aus *E. coli*

Dialysepuffer: 20 mM Tris-HCl, pH 7,5, 150 mM NaCl, 0,5 mM EDTA, 1 mM DTT,
(nach Ishimi, 1997) 0,1 mM PMSF, 0,01% TritonX-100, 20 % (v/v) Glycerin

Zur Langzeitaufbewahrung wurden die Proteine nach der Aufreinigung gegen einen Glycerin und Proteaseinhibitor enthaltenden Puffer dialysiert. Hierzu wurden Dialysemembranen mit einem MWCO von 12 kDa verwendet. Anschließend wurden die Proben in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -70°C aufbewahrt.

2.2.6.5. Spektralphotometrische Proteinkonzentrationsbestimmung

Für die Konzentrationsbestimmung einzelner Proben wurde die Proteinlösung im entsprechenden Puffer verdünnt und ein UV-Absorptionsspektrum von 220 bis 320 nm mit einem Beckman DU640-Spektrophotometer aufgenommen. Die Messung erfolgte in Quarzküvetten mit einer Schichtdicke von 10 mm. Als Referenz diente der entsprechende Puffer. Aus der Absorption bei 280 nm konnte nach dem Lambert-Beerschen Gesetz die Proteinkonzentration berechnet werden. Die notwendigen Extinktionskoeffizienten für MCM8 wurden mit dem Programm Vector NTI ermittelt. Da MCM8 vermutlich mit DNA interagiert, wurde außerdem das Verhältnis OD_{260}/OD_{280} bestimmt. Wenn dieses unterhalb von 0,6 lag, wurden die Proteine weiter verwendet.

2.2.6.6. Bradford-Test

Für eine größere Anzahl von Proben wurde die Gesamtproteinkonzentration kolorimetrisch nach Bradford (Bradford, 1976) im Mikrotiterplattenformat bestimmt. Die Proben wurden mittels VIS-Spektroskopie in einer 96-Well-Platte auf einem Plattenlesegerät Universal Microplate Spectralphotometer (MWG-Biotech, Ebersberg) quantifiziert. Als Referenz diente der entsprechende Puffer. Für die Erstellung der Eichkurve wurden BSA-Lösungen definierter Konzentration (0, 2, 5, 10, 15, 30, 50 ng/μl) verwendet. Zu jeweils 50 μl Standard bzw. Probe wurden je 150 μl Roti®Nanoquant (Roth, Karlsruhe) in eine 96-Well-UV-Star Platte (Greiner Bio- One) pipettiert. Die Absorption der Proben wurde bei 590 nm und 450 nm gemessen. Aus den ermittelten Absorptionswerten der BSA-Lösungen wurde der Quotient aus A590 und A450 gebildet und zur Erstellung einer Eichkurve verwendet. Die Berechnung der Proteinmenge in den Proben erfolgte mittels der geräteeigenen Software KC4 (Bio Tek Instruments, Neufahrn).

2.2.6.7. Rückfaltung von denaturiertem Protein (Vincentelli *et al.*, 2004)

Puffer: siehe (Maiorano *et al.*, 2005; Vincentelli *et al.*, 2004)

Der Rückfaltungs-Screen nach Vincentelli ermöglicht es, eine große Anzahl von Rückfaltungsbedingungen im Mikrotiterplattenformat zu testen.

Für die Rückfaltung wurden MCM8-haltige Fraktionen verwendet, welche aus *E. coli* Harnstoff-Extrakten (2.2.1.6) über Protino-Ni-IDA (2.2.6.1.2) denaturierend gereinigt wurden. Nach der Aufreinigung wurde die Proteinkonzentration der vereinigten Fraktionen bestimmt (2.2.6.6) und für den Screen auf eine Proteinkonzentration von 5 g/l eingestellt. Anschließend wurden die Cysteinreste durch Zugabe von 10 mM 2-Mercaptoethanol reduziert. Pro Well einer 96-Well-Platte wurden zu 95 μl des jeweiligen Puffers 5 μl Proteinlösung gegeben, durch kurzes Schwenken der Platte gemischt und die optische Dichte bei 350 nm bestimmt. Eine OD_{350} unter 0,05 zeigt an, dass das Protein in Lösung geblieben ist, wohingegen ein Wert über 0,05 auf ausgefallenes Proteins hindeutet.

2.2.6.8. Glyceringradientenzentrifugation

Puffer A: 17 % Glycerin in PBS (2.2.4.2), 2 mM MgCl₂, 0,1 mM 2-Mercaptoethanol

Puffer B: 34 % Glycerin in PBS (2.2.4.2), 2 mM MgCl₂, 0,1 mM 2-Mercaptoethanol

Die Ultrazentrifugation im Glyceringradienten wurde verwendet, um MCM8 von seinen kleineren Degradationsprodukten zu trennen und um eine mögliche Multimerisierung von MCM8 nachzuweisen. Der Gradient mit einem Volumen von 11 ml wurde mit einer FPLC LKB Gradient Pump 2249 (Pharmacia) unter Verwendung der Puffer A und B in Ultrazentrifugationsröhrchen (Herolab, Wiesloch) gegossen. Für die Glyceringradientenzentrifugation wurden MCM8-haltige Fraktionen verwendet, welche über Protino-Ni-IDA und EMD-Heparin nativ gereinigt wurden. Je 800 µl dieser Fraktionen wurden auf den Gradienten geladen. Um die Größe der Proteine im Gradienten zu bestimmen, wurde als Standard ein Ansatz mit je 40 µg BSA (67 kDa), β-Galaktosidase (112 kDa), α-Makroglobulin (170 kDa), Myosin (212 kDa), Kaninchen-Myosin (250 kDa) und Thyreoglobulin (660 kDa) in einem separaten Ultrazentrifugationsröhrchen mitgeführt. Die Zentrifugation wurde in der Ultrazentrifuge Centrikon T-1055 (Kontron Instruments, Neufahrn) mit einem TST 41.14 Rotor für 20 h bei 10 °C mit 40000 Umdrehungen pro Minute durchgeführt. Anschließend wurde der Gradient in 500 µl – Aliquots fraktioniert und der Proteingehalt der Fraktionen mittels Bradford-Test (2.2.6.6) untersucht. Der Vergleich mit dem Standard auf einem SDS-Gel erlaubte eine Aussage über die Molekülmasse der Proteine in den einzelnen Fraktionen.

2.2.6.9. Thrombin-Verdau

Um den Einfluss des His-Tags auf die ATPase-Aktivität von MCM8 zu untersuchen, wurde dieser durch einen Thrombin-Verdau entfernt. Dies wurde durch eine zwischen dem His-Tag und dem N-Terminus von MCM8 vorhandene Thrombinschnittstelle ermöglicht. Für den Thrombin-Verdau wurden MCM8-haltige Fraktionen verwendet, welche über Talon und EMD-Heparin nativ gereinigt wurden. Je Fraktion wurden 40 µl Proteinlösung eingesetzt und nach Angaben des Herstellers verdaut. Zum Test der Aktivität des Thrombins wurden Ansätze mit einem 48 kDa großen Kontrollprotein mitgeführt, welches durch den Verdau mit Thrombin in ein 35 kDa- und 13 kDa- Teilstück geschnitten wird. Die Effizienz des Verdau wurde per SDS-PAGE analysiert.

2.2.7. Elektrophoretische Methoden

2.2.7.1. Agarose-Gelelektrophorese zur DNA-Analyse

1x TAE: 40 mM Tris-Ac; 1 mM EDTA; pH ~8,5

1x TBE: 90 mM Tris-Borat; 2 mM EDTA; pH ~8,3

DNA-Farbmarker: 0,1 % Xylencyanol; 0,1 % Bromphenolblau; 0,1 mM EDTA; 75 % Glycerin

Zur Größen- und Konzentrationsabschätzung sowie zur präparativen Aufreinigung von Nukleinsäure-Fragmenten wurden Agarosegele mit einer Agarosekonzentration von 0,8 % - 3 % (w/v) Agarose in 1 x TBE bzw. TAE verwendet. Als Laufpuffer diente 1 x TBE- bzw. TAE-Puffer. Die Elektrophorese wurde bei 70 (präparative Gele) bzw. 150 Volt (analytische Gele) durchgeführt. Die DNA-Lösungen wurden mit 1/5 Volumen DNA-Farbmarker versetzt und in die Geltaschen pipettiert. Zur Visualisierung der DNA wurden die Gele nach dem Lauf entweder mit Ethidiumbromid (2.2.7.1.1) oder mit SYBR-Safe (2.2.7.1.2) gefärbt.

2.2.7.1.1. Detektion von DNA mittels Ethidiumbromid

Zur Detektion der Nukleinsäuren mit Ethidiumbromid wurden die Gele 10 – 15 min in einer Ethidiumbromid-Lösung (0,5 µg/ml) gefärbt, im Wasserbad entfärbt und unter UV-Durchlicht kontrolliert. Aus präparativen Gelen wurde die entsprechende DNA-Bande ausgeschnitten und anschließend unter UV-Durchlicht kontrolliert.

2.2.7.1.2. Detektion von DNA mittels SYBR-Safe

Zur Detektion der Nukleinsäuren mit SYBR-Safe wurden die Gele 10 - 15 min im SYBR-Safe-Bad gefärbt und unter Blaulicht kontrolliert.

2.2.7.2. Diskontinuierliche SDS-PAGE nach Schagger und v. Jagow zur Protein-Analyse (Schagger & von Jagow, 1987)

2 x Probenauftragepuffer: 0,1 M Tris/HCl, pH 6,8, 8 % (w/v) SDS, 24 % (v/v) Glycerin,
4 % (v/v) 2-Mercaptoethanol, 0,05 % (v/v) Coomassie 250 G

Kathodenpuffer: 0,1 M Tris, 0,1 M Tricin, 0,1% (w/v) SDS, pH 8,25 durch HCl

Anodenpuffer: 0,2 M Tris, pH 8,9 durch HCl

Gelpuffer: 1 M Tris-Base, 0,1% SDS, pH 8,45 durch HCl

Trenngel: 9-% (v/v) Acrylamid:Bisacrylamid (29:1) in Gelpuffer und 15% Glycerin

Sammelgel: 6% (v/v) Acrylamid:Bisacrylamid (29:1) in Gelpuffer

Bei der SDS-PAGE (Polyacrylamid-Gelelektrophorese) werden Proteine durch Wanderung in einem elektrischen Feld ihrer Größe nach aufgetrennt. An jede Aminosäure eines Proteins lagern sich zwei SDS-Moleküle an. So erhält jedes Protein abhängig von seiner Größe eine entsprechende negative Ladung. Vor dem Auftragen auf das Gel wurden die Proben mit 1 Volumen 2 x Probenauftragepuffer versetzt und 5 min bei 95 °C denaturiert. Die Elektrophorese wurde mit einer *mighty small*-Apparatur (Hoefer, San Francisco, USA) bei 10 W für ca. 1 h durchgeführt.

2.2.7.3. Diskontinuierliche SDS-PAGE nach Laemmli zur Protein-Analyse (Laemmli, 1970)

4 x Trenngelpuffer:	1,5 M Tris/HCl, pH 8,8, 0,4 % (w/v) SDS
4 x Sammelgelpuffer:	0,5 M Tris/HCl, pH 6,8, 0,4 % (w/v) SDS
Laufpuffer:	33 mM Tris/HCl, 190 mM Glycin, 0,1 % (w/v) SDS
2 x Probenauftragepuffer:	125 M Tris/HCl, pH 6,8, 3 % (w/v) SDS, 20 % (v/v) Glycerin, 3% 2-Mercaptoethanol, 0,02 % (w/v) Bromphenolblau
Trenngel:	8,5-% (v/v) Acrylamid:Bisacrylamid (29:1) in 1x Gelpuffer und 15% Glycerin
Sammelgel:	5% (v/v) Acrylamid:Bisacrylamid (29:1) in 1x Gelpuffer

Die Proben wurden hier ebenfalls vor dem Auftragen mit 1 Volumen Probenauftragepuffer versetzt und 5 min bei 95 °C denaturiert. Die Elektrophorese wurde mit einer *mighty small*-Apparatur (Hoefer, San Francisco, USA) bei 10 W für ca. 1 h durchgeführt.

2.2.7.4. Detektion von Proteinen in Gelen

2.2.7.4.1. Coomassie-Färbung

Färbelösung:	10% Essigsäure, 30% Ethanol, 0,2% Coomassie 250 G
Entfärbelösung:	10% Essigsäure, 30% Ethanol

Diese Methode wurde verwendet, um höhere Mengen an Protein (>100 ng) nachzuweisen. Hierfür wurde das Gel nach der Elektrophorese in der Färbelösung für etwa eine Stunde unter Schütteln gefärbt. Anschließend wurde es so lange unter mehrfachem Wechseln der Entfärbelösung entfärbt, bis der Gelhintergrund fast farblos erschien. Das Gel wurde anschließend entweder auf Filterpapier (Geltrockenapparatur Minidry D61) bzw. in Cellophanfolie (Roche) getrocknet.

2.2.7.4.2. Western-Blot

1x Transferpuffer: 25 mM Tris-Base, 192 mM Glycin, pH 8,6 mit HCl eingestellt

Vor dem Transfer wurden PVDF-Membranen vor dem Äquilibrieren durch Schwenken in 99,8 % Ethanol aktiviert.

Nach der SDS-PAGE wurden die Proteine aus Schaegger/v. Jagow- bzw. Lämmli-Gelen durch *semi-dry blotting* (mit geringer Puffermenge) in einer Panther-Semidry-Electroblotter-HEP1-Apparatur (Thermo Scientific Owl Separation Systems) oder einer Trans-Blot-Semidry-transfer-cells-Apparatur (Bio-Rad Laboratories) auf eine Nitrocellulose- oder PVDF-Membran übertragen. Dazu wurden vier Lagen Filterpapier, das Gel und die Membran kurz in Transferpuffer äquilibriert und anschließend so übereinandergelegt, dass Gel und Membran zwischen je zwei Lagen Filterpapier zu liegen kommen. Die Membran liegt dabei zwischen dem Gel und dem Pluspol der Apparatur. Die Proteine sind aufgrund ihrer Besetzung mit SDS-Molekülen negativ geladen und wandern bei angelegter Spannung zum Pluspol auf die Membran. Der Transfer erfolgte bei 1 - 2 mA/cm² für mindestens 1,5 h.

Antikörperreaktion

1xTBS-T: 100 mM Tris-HCl pH 8,0, 150 mM NaCl, 0,05 % Tween®20

Blocking-Puffer: 5 % (w/v) Milchpulver + 2% (w/v) BSA in TBS-T (filtriert)

1x AP-Puffer: 100 mM Tris-Base, 100 mM NaCl, 5 mM MgCl₂, pH 9,5 mit HCl eingestellt

NBT: Nitroblau-Tetrazoliumchlorid (30 mg/ml in 70% (v/v) DMF)

BCIP: 5-Brom-4-chlor-3-indoxylphosphat (15 mg/ml in DMF)

Zum Blockieren aller noch vorhandenen unspezifischen Proteinbindungsstellen wurde die Membran nach dem Transfer mit Blocking-Puffer inkubiert. Für den Nachweis des Strep-Tags wurde Blocking-Puffer ohne Milchpulver verwendet, da StrepTactin an das in der Milch enthaltene Biotin bindet. Nach dem Blockieren wurde die Membran zunächst 3 x für 10 min mit TBS-T gewaschen und dann mit Primärantikörper in einer 1:500-1:10000 Verdünnung in Blocking-Puffer für mindestens 2 h inkubiert. Anschließend wurde die Membran wie oben gewaschen und, falls erforderlich, mit Sekundärantikörper in einer 1:7500-1:10000 in Blocking-Puffer für ebenfalls mindestens 2 h inkubiert. Danach wurde wieder wie oben gewaschen. Zum Nachweis des Strep-Tags war die Inkubation mit einem zweiten Antikörper nicht erforderlich, da das verwendete StrepTactin mit alkalischer Phosphatase (AP) konjugiert war. Zur Farbentwicklung der AP-gekoppelten Sekundärantikörper wurde die Membran in 20 ml AP-Puffer überführt und anschließend 100 µl BCIP sowie 100 µl NBT zugegeben. In diesem Gemisch wurde die Membran unter Lichtausschluss bis zur Entwicklung gut erkennbarer Banden inkubiert. Danach wurde die Reaktion durch Waschen mit H₂O gestoppt und die Membran an der Luft getrocknet.

Eine Visualisierung der Banden durch Chemolumineszenzreaktion wurde für AP- sowie HRP (Meerrettich-Peroxidase)-gekoppelte Sekundärantikörper verwendet. Für die ECL-Reaktion (Peroxidase/H₂O₂-katalysierte Oxidation des zyklischen Diacylhydrazids Luminol unter alkalischen

Bedingungen) wurden zwei kommerzielle Lösungen zu gleichen Teilen gemischt (*Super Signal West Pico* bzw. *Femto Enhancer Solution* und *Super Signal West Pico Stable Peroxid Solution*) und auf die Membran pipettiert. Bei der alkalischen Phosphatase wurde die Membran mit *Immun-Star AP substrate* benetzt. Für beide Reaktionen wurde die Membran für jeweils 5 Minuten inkubiert. Anschließend erfolgte die Exposition eines Kodak BioMax MR Röntgenfilms (Sigma-Aldrich) und die Entwicklung mit der Dunkelkammerentwicklungsmaschine AGFA Classic E.O.S. (Siemens).

2.2.8. Untersuchungen der Proteinaktivität durch Bestimmung der ATPase-Aktivität

2.2.8.1. Hybridisierung von DNA

Für die Überprüfung der DNA-abhängigen ATPase-Aktivität von MCM8 wurden kurze doppelsträngige DNA-Moleküle benötigt. Die Hybridisierung komplementärer Oligodesoxynukleotide wurde mit Hilfe eines Thermocyclers durchgeführt. Hierfür wurde das Oligonukleotidgemisch zuerst auf 95 °C erhitzt, um alle eventuellen Sekundärstrukturen zu lösen. Danach wurden die Proben zur Hybridisierung der komplementären Stränge langsam (0,02 K/s) auf 4 °C abgekühlt.

2.2.8.2. ATPase-Assay

Reaktionspuffer NEB 4 (New England Biolabs) + BSA:

20 mM Tris-Ac; 50 mM KAc; 10 mM MgAc; 1 mM DTT; 0,5 mg/ml BSA; pH 7.9

Reaktionspuffer (nach Ishimi, 1997):

50 mM Tris-HCl pH 7,9; 5 mM MgCl₂; 0,5 mg/ml BSA; 20 mM 2-Mercaptoethanol; 10 µM ATP

Um MCM8 und seine Varianten auf die enzymatische Aktivität der ATP-Hydrolyse hin zu untersuchen, wurden in einem 10 µl Reaktionsansatz 1 x Reaktionspuffer, 2,0 nM [γ -³²P]-ATP (3000 Ci/mmol) und 2 - 4 µl Protein für 1 - 2 h bei 37 °C inkubiert. Zur Untersuchung der Induzierbarkeit der ATPase-Aktivität durch DNA enthielt der Reaktionsansatz zusätzlich entweder 0,1 - 0,8 µg Einzelstrang- bzw. Doppelstrang-Plasmid-DNA (pBLue_pRN1, pB-pRN1-ins bzw. pRN1_rev) oder Einzelstrang- bzw. Doppelstrang-Oligodesoxynukleotid-DNA (R659A, 46 b/bp). Im Anschluss an die Inkubation wurden 2 µl des Reaktionsansatzes auf eine PEI Cellulose Dünnschichtchromatographieplatte (Macherey & Nagel GmbH & Co. KG, Düren) aufgetragen. Die Membran wurde aufrecht in einen Tank gestellt, der ca. 1 cm hoch mit 0,8 M LiCl in 1 M Formiat gefüllt war. Die Trennung von ³²P_i und γ -[³²P]-ATP erfolgte für ca. 20 min durch Wanderung des Trennmittels auf der Dünnschichtchromatographieplatte. Anschließend wurden die DC-Platten getrocknet und autoradiographisch mit einem Flächenzählgerät (Instant/imager 2024, Canberra Packard, Schwadorf, Österreich) analysiert. Die Quantifizierung erfolgte mit Hilfe der Gerätesoftware.

2.2.9. Identifizierung von Protein-Protein Interaktionen durch Co-Immunopräzipitation

2.2.9.1. Immunopräzipitation mit magnetischen Partikeln

Für die Immunopräzipitation mit magnetischen Partikeln wurde das *μMACS Protein G MicroBeads*™ Kit (Miltenyi Biotec) verwendet. Als Prinzip liegt zugrunde, dass Antikörper für die selektive Isolierung eines bestimmten Proteins aus einem Proteingemisch verwendet werden. Der Antikörper wird direkt in die Proteinlösung gegeben, wo er an sein Antigen bindet. Anschließend werden magnetische Kügelchen (*MicroBeads*), an denen Protein A bzw. G gekoppelt ist, in die Lösung gegeben. Über Protein A bzw. G wird der Antikörper mit dem Zielprotein und möglichen Liganden an die Kügelchen gebunden. Diese werden im *μMACS*-Separator an eine magnetisierte Matrix fixiert und können so gewaschen und eluiert werden.

160 - 250 μ l Zellextrakt (2.2.3.7 oder 2.2.4.4.2) wurden mit 2 μ g des spezifischen polyklonalen Antikörpers bzw. 2 - 5 μ l des Antiserums und 70 μ l der Protein A bzw. Protein G-gekoppelten *MicroBeads* gemischt. Zur Unterstützung der Bildung des Antigen-Antikörper-*MicroBeads*-Komplexes wurde das Gemisch für 45 min bei 4 °C invertiert. Ein *μMACS*-Säulchen wurde in das magnetische Feld des *μMACS*-Separators gehängt und mit 200 μ l des entsprechenden Lysepuffers äquilibriert. Das Zellextrakt-Antikörper-*MicroBeads*-Gemisch wurde auf das Säulchen gegeben und durchtropfen gelassen, wobei der Komplex im magnetischen Feld der Säule festgehalten wurde. Der aufgefangene Durchfluss wurde mit Proteinauftragepuffer (2.2.7.3) versetzt und bis zur Analyse durch SDS-PAGE aufbewahrt. Anschließend wurde die Säule mit 200 μ l 20 mM Tris-Ac pH 8 gewaschen. Zur Elution der gebundenen Proteine wurden zunächst 20 μ l Proteinauftragepuffer (2.2.7.3) (95 °C) auf die Säule gegeben und für 5 min inkubiert. Durch Zugabe von weiteren 50 μ l Proteinauftragepuffer (2.2.7.3) (95 °C) wurden die Proteine eluiert. Das Eluat wurde in einem neuen Reaktionsgefäß aufgefangen und mittels SDS-PAGE analysiert.

2.2.9.2. Immunopräzipitation mit GammaBind Plus Sepharose

IP-Waschpuffer: 50 mM Tris-Ac pH 8; 150 mM KAc; 1,5 mM MgAc₂; 0,5 % Nonidet P-40;
10 mM NaF; 2 mM Na₃VO₄

Das zugrundeliegende Prinzip ist analog der Immunopräzipitation mit magnetischen Partikeln (2.2.9.1), jedoch ist Protein G hier an Sepharose gekoppelt. Die Sepharose wird zum Zellextrakt gegeben und durch Zentrifugation sedimentiert, so dass sich das Zielprotein im Sediment befindet und so gewaschen und eluiert werden kann. Vor Verwendung wurde die Sepharose durch Zentrifugation sedimentiert (2 min, 300 g) und der Überstand (Lagerungsmittel Ethanol) entfernt. Die Sepharose wurde in 1 ml kaltem PBS (2.2.4.2) gewaschen und abzentrifugiert. Das Sepharose-Sediment wurde in 2 Sedimentvolumen des entsprechenden Lysepuffers aufgenommen.

Zum Entfernen unspezifisch bindender Proteine (*preclearing*) wurden zunächst 5 µg unspezifischer Kaninchen-Antikörper (K32pre Kaninchen Serum) zu 200 µl Zellextrakt (2.2.3.7) gegeben und für 1 h bei 4 °C invertiert. Anschließend wurden 20 µl GammaBind Plus Sepharose zum Zellextrakt gegeben. Nach Zugabe der Sepharose wurde der Zellextrakt für 1 h bei 4 °C invertiert. Anschließend wurde die Sepharose durch Zentrifugation sedimentiert (5 min, 500 g). Der Überstand wurde in ein neues Reaktionsgefäß überführt. Es wurden 2 - 30 µg des spezifischen polyklonalen Antikörpers bzw. 2 - 5 µl des Antiserums zugegeben und über Nacht bei 4 °C invertiert. Als Kontrolle wurde ein Ansatz mit dem für das *preclearing* eingesetzten unspezifischen Antikörper mitgeführt. Am folgenden Tag wurden 20 µl Sepharose zugegeben und für 2 h bei 4 °C invertiert. Anschließend wurde die Sepharose durch Zentrifugation sedimentiert (5 min, 500 g). Der Überstand wurde abgenommen, 60 µl davon mit 20 µl Proteinauftragepuffer (2.2.7.3) versetzt und für spätere Analysen bei 4 °C gelagert. Der restliche Überstand wurde auf -20 °C eingefroren. Die Sepharose mit den gebundenen Proteinen wurde 3 x mit je 500 µl IP-Waschpuffer gewaschen und anschließend mit 50 µl Proteinauftragepuffer (2.2.7.3) versetzt. Die Proben wurden für 5 min auf 95 °C erhitzt und per SDS-PAGE analysiert.

3. Ergebnisse und Diskussion

Im Rahmen dieser Arbeit wurde die Expression von rekombinantem humanen MCM8-Protein in drei verschiedenen Expressionssystemen untersucht. Im ersten Abschnitt sind die Ergebnisse der Expression im Bakterium *Escherichia coli* zusammengefasst. In den darauffolgenden Abschnitten ist die Expression mit den eukaryotischen Systemen *Saccharomyces cerevisiae* und Insektenzellen beschrieben und im letzten Abschnitt wird die Interaktion von MCM8 mit CDC45 in humanen Zellen untersucht.

3.1. Expression von MCM8 in *Escherichia coli*

Im humanen Replikationszyklus spielen MCM-Proteine eine wichtige Rolle. MCM8 weist aufgrund seiner Domänenstruktur eine große Ähnlichkeit mit MCM 2-7 auf, was auf eine ähnliche Funktion schließen lässt (Gozuacik *et al.*, 2003; Maiorano *et al.*, 2005). Bislang gibt es noch keine Hinweise auf die Funktion des humanen MCM8-Proteins (im weiteren MCM8 genannt). Um die Funktion von MCM8 zu untersuchen, wurde zunächst *E. coli* als Expressionssystem gewählt, da bereits gezeigt wurde, dass sowohl MCM8 (Gozuacik *et al.*, 2003) als auch andere humane MCM-Proteine in *E. coli* erfolgreich exprimiert werden konnten (Yabuta *et al.*, 2003). Zur Expression von humanem MCM8 in *E. coli* wurde das MCM8-Gen in den Expressionsvektor pET28c eingeführt (Abb. 3.1). Hierdurch konnte die Expression der rekombinanten Proteine mit IPTG induziert werden. IPTG ist ein nicht-metabolisierbares Analogon der Galaktose. Wie diese bindet IPTG den *lac*-Repressor, so dass die *lac*-Operator-Sequenzen auf dem Expressionsplasmid freigegeben werden. So wird nach Induktion durch eine ausreichende Menge IPTG die Expression des rekombinanten Proteins erfolgen. Die für die verschiedenen Aminosäuren codierenden Basentriplets (Codons) in der mRNA werden in humanen Zellen und *E. coli* unterschiedlich häufig verwendet. Daher erfordert die Expression humaner Proteine in *E. coli* die Verwendung von Stämmen, welche durch zusätzliche plasmidcodierte tRNAs selten vorkommende Codons kompensieren. In dieser Arbeit wurde die Expression von MCM8 in den Stämmen BL21 (DE3), BL21 (DE3) CodonPlus und Rosetta 2 (DE3) pLysS untersucht.

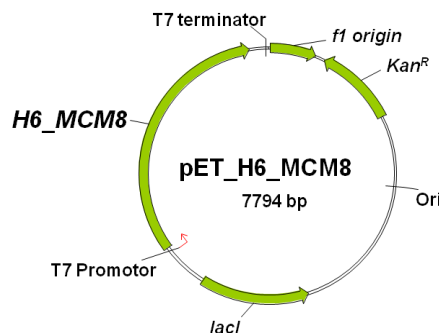


Abb. 3.1 Expressionsvektor pET28c_H6_MCM8 (pET_H6_MCM8) zur Expression von H6_MCM8 in *E. coli*

3.1.1. Löslichkeits- und Überexpressionsexperimente

3.1.1.1. Expression von MCM8 in *E. coli* BL21 (DE3) CodonPlus und Rosetta 2 (DE3) pLysS

Zur Überexpression verschiedener MCM8-Varianten mittels der Expressionsvektoren pET_H6_MCM8, pET_H6_MCM8_H6 bzw. pET_MCM8_H6 wurden *E. coli* BL21 (DE3) CodonPlus bzw. Rosetta 2 (DE3) pLysS verwendet, da diese einen großen Teil der in MCM8 vorkommenden seltenen Codons abdecken (Tab. 3.1).

Aminosäure	Seltenes Codon	Häufigkeit in MCM8	tRNAs verfügbar durch BL21 Co ⁺ RIL	tRNAs verfügbar durch Ros. 2 pLysS
Arginin	CGA	8		
	CGG	5		+
	AGG	10	+	+
	AGA	22	+	+
Glycin	GGA	31		+
	GGG	6		
Isoleucin	AUA	11	+	+
Leucin	CUA	13	+	+
Prolin	CCC	4		+
Threonin	ACG	3		

Tab. 3.1 Abdeckung der in *E. coli* seltenen t-RNAs durch die Stämme BL21 (DE3) CodonPlus RIL bzw. Rosetta 2 pLysS Die Häufigkeit der seltenen Codons in MCM8 wurde mit dem Rare Codon Calculator auf <http://people.mbi.ucla.edu/sumchan/caltor.html> berechnet

Nach Induktion der Expression mit 1 mM IPTG wurden Proben nach 2 bzw. 4 Stunden entnommen und der Gesamtzellextrakt auf die Expression von MCM8 untersucht. Für beide Stämme konnte eine vergleichbare Expression der Proteine nachgewiesen werden (Abb. 3.2, Rosetta Daten nicht gezeigt). Für die N-terminal His-getaggten Varianten konnten im Western-Blot Proteolysefragmente beobachtet werden (Abb. 3.2 B), während bei beiden *E. coli*-Stämmen für C-terminal His-getaggtes MCM8 im Gesamtzellextrakt kein Proteolysefragment detektiert wurde. Dies könnte ein Hinweis darauf sein, dass MCM8_H6 in *E. coli* stabiler ist als die N-terminal His-getaggten Varianten. Möglicherweise ist aber auch das N-terminale Proteolysefragment stabiler als das C-terminale Proteolysefragment. Eine andere Möglichkeit besteht darin, dass der C-terminale His-Tag des Abbauprodukts trotz Denaturierung des Proteins maskiert ist und im so PAA-Gel nicht detektiert werden kann (Abb. 3.2 B). Im Falle einer Überexpression von MCM8 wird in einem PAA-Gel nach Coomassie-Färbung eine verstärkte Proteinbande auf Höhe von ca. 100 kDa erwartet (Abb. 3.2 B). Es konnte jedoch für alle drei Varianten keine Überexpression beobachtet werden, auch eine erhöhte Menge an Proteolysefragmenten wurde im Coomassie-gefärbten PAA-Gel nicht detektiert. Dies zeigt, dass die

Expression von MCM8 in diesen Zellen gering ist und nur zu einem geringen Prozentsatz der Gesamtproteinmenge entspricht.

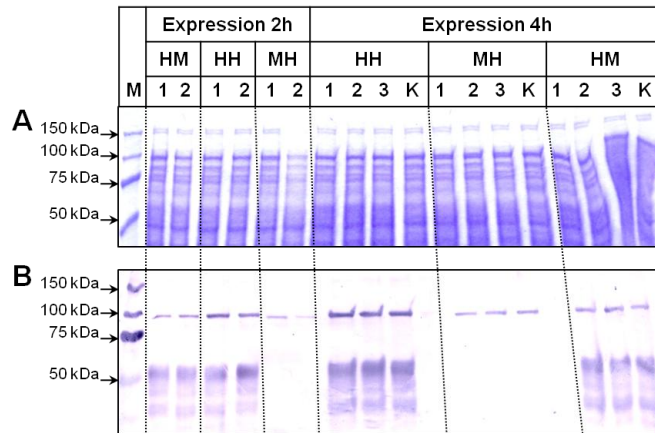


Abb. 3.2 MCM8 exprimiert durch *E. coli* BL21 (DE3) CodonPlus

Der Gesamtzellextrakt wurde per SDS-Page auf einem 9%igen PAA-Gel mit anschließender Coomassie-Färbung (A) bzw. Western-Blot (B) analysiert. Der immunchemische Nachweis von H6_MCM8 erfolgte mittels α -His6-Antikörper aus der Maus und AP-gekoppeltem Antikörper gegen Maus. M – Molekulargewichtsstandard; 1,2,3 – Protein aus Kulturen nach Induktion mit 1 mM IPTG; K – Protein aus uninduzierter Kontrollkultur; HM – H6_MCM8; HH – H6_MCM8_H6; MH – MCM8_H6

3.1.1.2. Verbesserung der Expression in Gegenwart von Glucose

Die beobachtete geringe Expression von MCM8 trotz Verwendung von Stämmen, welche die seltenen tRNAs bereitstellen, könnte möglicherweise mit einer Zytotoxizität des exprimierten Proteins zusammenhängen. In solchen Fällen ist es erforderlich die basale Expression zu verringern. Die Expression von Proteinen, die unter der Kontrolle des *lac*-Promotors stehen, hängt unter anderem von der Konzentration des entsprechenden Induktors in der Zelle ab. Es sind jedoch auch die Konzentrationen von cyclischem AMP (cAMP) sowie des CAP-Proteins (Catabolite Gene Activator Protein) von Bedeutung. Der cAMP/CAP-Komplex bindet oberhalb des *lac*-Promotors und stimuliert so die Transkription durch die RNA-Polymerase. Da die Bindung des CAP-Proteins an die DNA die Gegenwart von cAMP erfordert, hängt die Induktion der Transkription auch von der cAMP-Konzentration in der Zelle ab. Diese wird wiederum stark von der Kohlenstoffquelle im Medium beeinflusst. In Gegenwart von Glucose, einem leicht metabolisierbaren Monosaccharid, ist die Konzentration von cAMP niedrig. Dadurch ist die Transkription vom *lac*-Promotor reduziert. Durch die Zugabe von 1% Glucose zum Expressionsmedium kann so die basale Expression von rekombinanten Proteinen minimiert werden (Grossman *et al.*, 1998). Gleichzeitig muss die Induktion mit einer höheren IPTG-Konzentration erfolgen, um den inhibierenden Effekt der Glucose zu überwinden. Durch eine Reduktion der basalen MCM8-Expression wird eine potenziell toxische Wirkung von MCM8 auf das Zellwachstum minimiert. Dadurch kann eine höhere Zelldichte erreicht werden, was eine vermehrte Proteinexpression nach Induktion erwarten lässt.

Eine Testexpression von *E. coli* BL21 (DE3) CodonPlus pET_ MCM8_H6 wurde in Gegenwart von 1% Glucose bei 37°C durchgeführt und die Expression des rekombinanten Proteins mit 2 mM IPTG

induziert. Nach 1, 2, 3 bzw. 4 Stunden wurden gleiche Mengen an Zellen entnommen und das Gesamtzellextrakt per SDS-PAGE und Coomassie-Färbung auf eine Überexpression von MCM8_H6 untersucht. Eine Verbesserung der Expression in Gegenwart von Glucose konnte nicht festgestellt werden (Daten nicht gezeigt).

3.1.1.3. Erhöhung der Löslichkeit durch Variierung der IPTG-Konzentration und der Expressionstemperatur

Voruntersuchungen haben gezeigt, dass bei Induktion der Expression von MCM8 mit 1 mM IPTG bei 37°C das Protein unlöslich in Inklusionskörpern vorliegt (Abb. 3.3). Dies kann ein Hinweis darauf sein, dass MCM8 nicht die korrekte Faltungsstruktur annimmt. Um ihre biologischen Funktionen erfüllen zu können, müssen Proteine bestimmte räumliche Strukturen einnehmen, das heißt die Aminosäurekette muss sich in eine definierte dreidimensionale Struktur falten. Die Faltung rekombinanter Proteine ist ein sehr störanfälliger Prozess, da ungefaltete oder partiell gefaltete Proteine durch die Exposition hydrophober Bereiche leicht aggregieren.

Die Reduzierung der zur Induktion der Proteinexpression verwendeten Menge IPTG führt zu einer verminderten Expressionsrate des rekombinanten Proteins (Kopetzki *et al.*, 1989). Das hat zur Folge, dass dem Protein sowie den zelleigenen Faltungshelfern, den Chaperonen, mehr Zeit zur korrekten Faltung des rekombinanten Proteins zur Verfügung steht, da sie nicht durch übermäßige Expression überlastet sind. So kann das Protein seinen nativen Zustand erreichen, was zu einer verbesserten Löslichkeit des Proteins führen kann.

Für eine Testexpression wurde *E. coli* BL21 (DE3) CodonPlus pET_H6_MCM8 mit 1; 0,75; 0,5; 0,3; 0,25; 0,03; 0,1; 0,01 mM IPTG induziert. Nach 3,5 h Expression bei 37°C wurden die Zellextrakte durch SDS-PAGE und Western-Blot analysiert und das Vorhandensein sowie die Löslichkeit von H6_MCM8 überprüft. In allen Ansätzen wurde kein lösliches Protein detektiert (Daten nicht gezeigt). Zudem konnte das Volllängenprotein nur im Gesamtzellextrakt des Ansatzes mit 1 mM IPTG nachgewiesen werden, die übrigen Ansätze enthielten nur Abbauprodukte von MCM8 (Daten nicht gezeigt). Für die folgenden Experimente wurde die Proteinexpression daher mit 1 mM IPTG induziert.

Durch eine Absenkung der Expressionstemperatur kann die Löslichkeit von rekombinanten Proteinen erhöht werden (Kopetzki *et al.*, 1989; Schein, 1989; Schein, 1988), da bei niedriger Temperatur alle Schritte der Proteinsynthese und der Proteinfaltung langsamer verlaufen, so dass es weniger zu einer Anhäufung aggregationsanfälliger Faltungsintermediate kommt. Die Proteine haben so mehr Zeit, sich in ihre native Struktur zu falten.

Um den Einfluss der Expressionstemperatur auf die Löslichkeit von MCM8 zu untersuchen, wurde die Expression in *E. coli* BL21 (DE3) CodonPlus pET_H6_MCM8 bei verschiedenen Temperaturen durchgeführt. Lösliches MCM8 konnte sowohl bei Raumtemperatur als auch bei 15°C detektiert werden (Abb. 3.3). Eine Analyse der unlöslichen Fraktion zeigte jedoch, dass ein Großteil des exprimierten H6_MCM8 weiterhin unlöslich in Inklusionskörpern vorlag (Abb. 3.3).

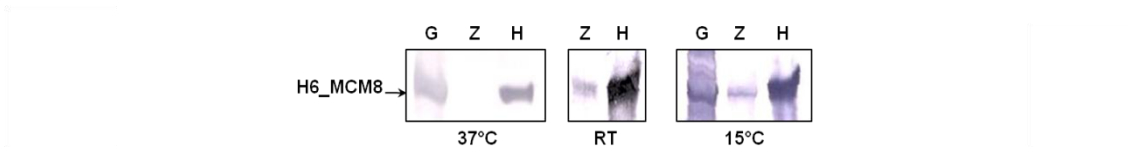


Abb. 3.3 Zellextrakte von *E. coli* BL21 (DE3) CodonPlus pET_H6_MCM8

Das Protein wurde bei verschiedenen Temperaturen exprimiert und mittels SDS-Page auf einem 9%igen PAA-Gel mit anschließendem Western-Blot analysiert. Der immunchemische Nachweis von H6_MCM8 erfolgte mittels α -His6-Antikörper aus der Maus und AP-gekoppeltem Antikörper gegen Maus (bei 37°C und RT) bzw. α -MCM8 N-term Antikörper aus dem Kaninchen und AP-gekoppeltem Antikörper gegen Kaninchen (bei 15°C). RT – Raumtemperatur; G – Gesamtzellextrakt; Z – Zellextrakt (lösliches Protein) ; H – Harnstoffextrakt

Um Aufschluss über die Funktionalität von MCM8 zu erhalten, wurde zunächst der lösliche Anteil des Proteins nativ aufgereinigt und auf mögliche Aktivität untersucht.

3.1.2. Untersuchung von H6_MCM8 und der Walker-A-Motiv-Mutante

H6_MCM8 K460E

Um die Aktivität des löslichen Anteils von H6_MCM8 zu überprüfen, wurde das Protein in *E. coli* BL 21 (DE3) CodonPlus bei Raumtemperatur exprimiert. Der Zellextrakt wurde über Protino-IDA-Affinitätschromatographie und EMD-SO₃⁻-Kationentauschchromatographie nativ aufgereinigt und mittels SDS-PAGE und Western-Blot analysiert (Abb. 3.4).

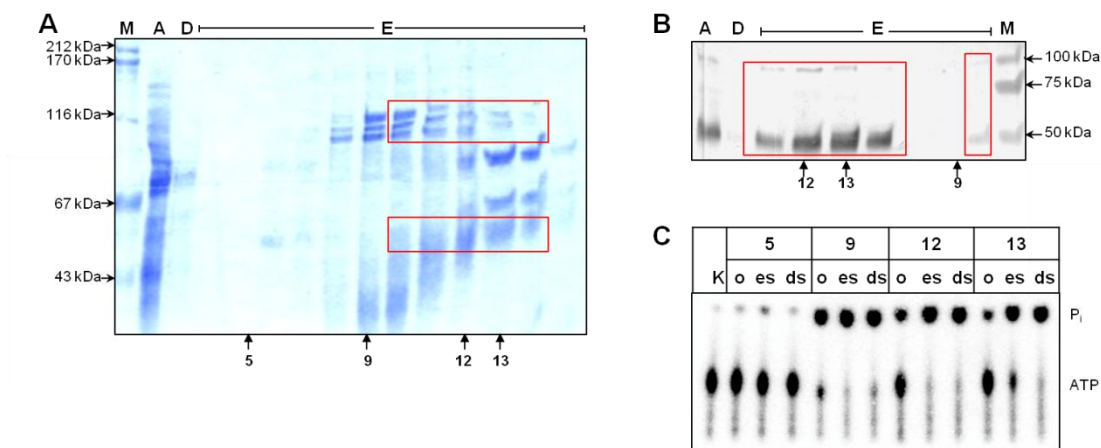


Abb. 3.4 Aufreinigung und ATPase-Aktivität von H6_MCM8

A+B: SDS-PAGE-Analyse des mittels Protino-Ni-IDA und EMD-SO₃⁻-Chromatographie aufgereinigten H6_MCM8 auf einem 9%igen PAA-Gel. Im Anschluss an die Elektrophorese wurden die Gele mit Coomassie gefärbt (A) bzw. im Western-Blot analysiert (B). Der immunchemische Nachweis von H6_MCM8 erfolgte mittels α -His6-Antikörper aus der Maus und AP-gekoppeltem Antikörper gegen Maus. M – Molekulargewichtsstandard; A – Säulenauftrag; D – Säulendurchbruch; E – Elutionsfraktionen. Rot markiert sind die Fraktionen, die H6_MCM8 (ca. 100 kDa) oder sein N-terminales Fragment (ca. 50 kDa) enthalten.

C: Repräsentative DC der ATPase-Reaktion der in A+B mit Pfeilen markierten Fraktionen. 2 μ l Protein, 2,0 nM γ -[³²P]-ATP und ggf. 0,4 μ g DNA in NEB4-Puffer wurden für 45 min bei 37°C inkubiert. K – Kontrollansatz Puffer ohne Protein; o – Ansatz ohne DNA; es – Ansatz mit Einzelstrang-Plasmid-DNA; ds – Ansatz mit Doppelstrang-Plasmid-DNA

In Elutionsfraktionen 11-14 konnte lösliches H6_MCM8 sowie sein N-terminales Abbauprodukt nachgewiesen werden (Abb. 3.4 A+B). Zusätzlich zu H6_MCM8 wiesen die Fraktionen einen hohen Anteil an kontaminierendem Protein auf. Dies war zum einen darauf zurückzuführen, dass der Anteil

des löslich im Zellextrakt vorliegenden His-getaggtten Zielproteins gering war. Dies konnte zu unspezifischer Bindung anderer im Zellextrakt enthaltener Proteine an das Chromatographiematerial führen, da nicht alle vorhandenen Bindestellen vollständig durch das Zielprotein besetzt wurden. Außerdem können durch unspezifische Interaktion von Proteinen des Zellextraktes mit H6_MCM8 Kontaminationen entstehen.

Für *Xenopus laevis* MCM8 sowie humane und Maus-MCM-Proteine wurde bereits gezeigt, dass die Hydrolyse von ATP nur in Gegenwart von DNA stattfindet (Ishimi, 1997; Maiorano *et al.*, 2005; You *et al.*, 2002). Das Gleiche wurde für das homohexamere MCM-Protein aus *Methanothermobacter thermoautotrophicus* gezeigt (Kelman *et al.*, 1999; Shechter *et al.*, 2000). Das von MCM8 favorisierte DNA-Substrat ist nicht bekannt. Deshalb wurde zur Überprüfung der Aktivität von H6_MCM8 die ATPase-Aktivität der H6_MCM8-enthaltenden Elutionsfraktionen der EMD-SO₃⁻-Kationentauschchromatographie in Gegenwart von Einzelstrang-DNA, Doppelstrang-DNA und ohne DNA bestimmt (Abb. 3.4 C; Fraktionen Nr. 12 und 13). Es wurde erwartet, dass die Aktivität von H6_MCM8 ohne DNA gering ist, wohingegen die ATP-Hydrolyse in Gegenwart von DNA durch die angenommene Entwindungsaktivität deutlich erhöht sein sollte. Fraktionen Nr. 5 und Nr. 9 wurden als Kontrollen mitgeführt, in beiden wurde H6_MCM8 nicht nachgewiesen. Sollte die ATPase-Aktivität nur von H6_MCM8 ausgehen, wurde von diesen Fraktionen keine ATPase-Aktivität erwartet.

In Fraktionen Nr. 12 und Nr. 13 wurden im Ansatz ohne DNA bereits 18-29% des vorhandenen ATPs hydrolysiert. In Gegenwart von Einzelstrang- wie Doppelstrang-Plasmid-DNA war die ATP-Hydrolyse auf 60-74% erhöht. Fraktion Nr. 5 zeigte nur in Gegenwart von einzelsträngiger DNA eine leicht erhöhte ATP-Hydrolyse von 5%. In Fraktion Nr. 9 zeigte sich ohne DNA eine ATP-Hydrolyse von 65% und mit DNA 73-80%. Die hohe ATPase-Aktivität der Elutionsfraktion Nr. 9, die kein detektierbares H6_MCM8 enthielt, wies auf eine Kontamination durch Protein mit ATPase-Aktivität hin. Da die ATPase-Aktivität durch DNA gesteigert werden konnte, handelte es sich dabei vermutlich um ein DNA-abhängiges Protein. Daher konnte hier die detektierte ATPase-Aktivität nicht eindeutig H6_MCM8 zugeordnet werden.

Um genaueren Aufschluss darüber zu erhalten, ob die ATPase-Aktivität auf H6_MCM8 zurückzuführen ist, wurde die Mutante H6_MCM8 K460E untersucht. Es wurde bereits für das analoge Protein aus *Xenopus* (Maiorano *et al.*, 2005) gezeigt, dass eine Punktmutation im Walker-A-Motiv ausreicht, um XMCM8 in seiner Funktion zu beeinträchtigen. Durch einen Austausch des konservierten Lysins455 gegen Alanin konnte bei XMCM8 keine ATPase-Aktivität mehr nachgewiesen werden, während für das Wildtyp-Protein eine durch DNA stimulierbare ATPase-Aktivität detektiert wurde.

Bei H6_MCM8 wurde durch Quickchange-Mutagenese ein Lysin in der Walker-A-Motiv-codierenden Sequenz auf dem Ausgangsplasmid pET_H6_MCM8 durch Glutaminsäure ersetzt. Das resultierende Protein H6_MCM8 K460E sollte nicht mehr in der Lage sein, ATP zu hydrolysieren (Maiorano *et al.*, 2005).

H6_MCM8 K460E wurde in *E. coli* BL 21 (DE3) CodonPlus analog dem Wildtyp-Protein exprimiert und aus dem Zellextrakt aufgereinigt. In Elutionsfraktionen 10-15 konnte lösliches H6_MCM8 sowie sein N-terminales Abbauprodukt nachgewiesen werden (Abb. 3.5 A+B). Auch hier wiesen die Elutionsfraktionen einen hohen Anteil an kontaminierendem Protein auf (Abb. 3.5 A).

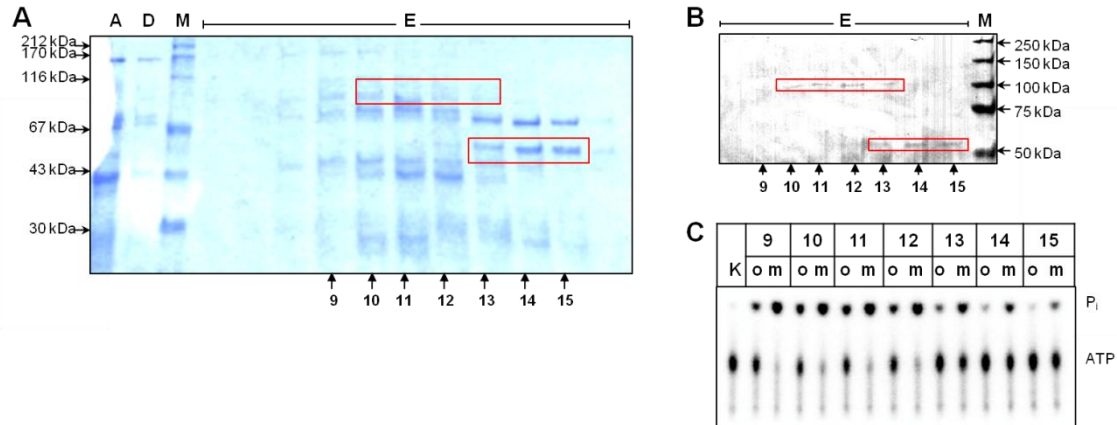


Abb. 3.5 Aufreinigung und ATPase-Aktivität von H6_MCM8 K460E

A+B: SDS-PAGE-Analyse des mittels Protino-Ni-IDA und EMD-SO₃-Chromatographie aufgereinigten H6_MCM8 K460E auf einem 9%igen PAA-Gel. Im Anschluss an die Elektrophorese wurden die Gele mit Coomassie gefärbt (A) bzw. im Western-Blot analysiert (B). Der immunchemische Nachweis von H6_MCM8 K460E erfolgte mittels α -His6-Antikörper aus der Maus und AP-gekoppeltem Antikörper gegen Maus. M – Molekulargewichtsstandard; A – Säulenauftrag; D – Säulendurchbruch; E – Elutionsfraktionen. Rot markiert sind die Fraktionen, die H6_MCM8 (ca. 100 kDa) oder sein N-terminales Fragment (ca. 50 kDa) enthalten.

C: Repräsentative DC der ATPase-Reaktion der in A+B mit Pfeilen markierten Fraktionen. 2 μ l Protein, 1,3 nM γ -[³²P]-ATP und ggf. 0,4 μ g DNA in NEB4-Puffer wurden für 50 min bei 37°C inkubiert. K – Kontrollansatz Puffer ohne Protein; o – Ansatz ohne DNA; m – Ansatz mit einer 1:1-Mischung von Einzel- und Doppelstrang-Plasmid-DNA

Der ATPase-Assay von H6_MCM8 K460E-enthaltenden Fraktionen (Abb. 3.5 C) zeigte im Ansatz ohne DNA (Fraktionen 10-12) eine ATP-Hydrolyse von 27-35%. In Gegenwart einer Mischung aus Einzel- und Doppelstrang-Plasmid-DNA war hier die ATP-Hydrolyse auf 60-63% erhöht. Wie beim Wildtyp-Protein bewirkte die Gegenwart von DNA eine Steigerung der ATP-Hydrolyse um den Faktor zwei. Fraktion Nr. 9 wurde als Kontrolle mitgeführt, hier wurde H6_MCM8 K460E nicht nachgewiesen (Abb. 3.5 B). Hier zeigte sich ohne DNA eine ATP-Hydrolyse von 23%, in Gegenwart von Plasmid-DNA eine 69%ige ATP-Hydrolyse. In den Fraktionen Nr. 14 und Nr. 15 wurde nur ein N-terminales Proteolysefragment von H6_MCM8 K460E nachgewiesen (ca. 55 kDa). Hier zeigte sich ohne DNA eine ATP-Hydrolyse von 3-5%, in Gegenwart von Plasmid-DNA eine ATP-Hydrolyse von 15-24%.

Da für die Mutante H6_MCM8 K460E keinerlei ATPase-Aktivität erwartet wird, weist die hohe ATP-Hydrolyserate in den getesteten Fraktionen auf eine Kontamination mit ATPase-aktivem Protein hin.

Um zu überprüfen, ob bei der Aufreinigung von MCM8 kontaminierende ATPase-aktive Proteine durch unspezifische Interaktion mit dem Säulenmaterial mit aufgereinigt wurden, wurde *E. coli* BL21 CodonPlus mit pET_28c, der keine MCM8-codierende Sequenz trägt, transformiert. Analog zur Vorgehensweise bei H6_MCM8 und H6_MCM8 K460E wurde die Expression und Aufreinigung durchgeführt und mittels SDS-PAGE und Western-Blot analysiert (Abb. 3.6).

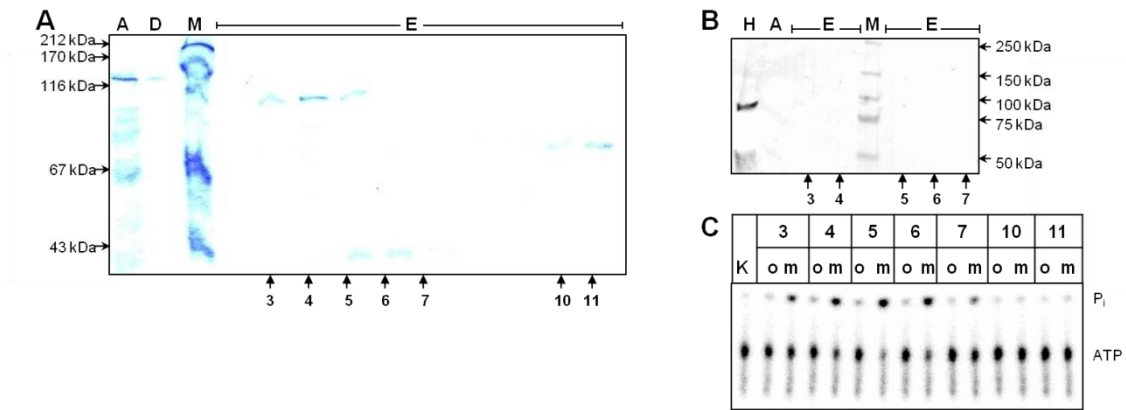


Abb. 3.6 Aufreinigung und Hintergrund-ATPase-Aktivität von Zellextrakt ohne MCM8-Expression

A+B: SDS-PAGE-Analyse der mittels Protino-Ni-IDA und EMD-SO₃⁻-Chromatographie aufgereinigten Proteine auf einem 9%igen PAA-Gel. Im Anschluss an die Elektrophorese wurden die Gele mit Coomassie gefärbt (A) bzw. im Western-Blot analysiert (B). Der immunchemische Nachweis von H6_MCM8 erfolgte mittels α -His6-Antikörper aus der Maus und AP-gekoppeltem Antikörper gegen Maus. H – H6_MCM8 aus *E.coli* Harnstoffextrakt (Positivkontrolle); M – Molekulargewichtsstandard; A – Säulenauftrag; D – Säulendurchbruch; E - Elutionsfraktionen. **C:** Repräsentative DC der ATPase-Reaktion der in A+B mit Pfeilen markierten Fraktionen. 2 μ l Protein, 2,0 nM γ -[³²P]-ATP und ggf. 0,4 μ g DNA in NEB4-Puffer wurden für 45 min bei 37°C inkubiert. K – Kontrollansatz Puffer ohne Protein; o – Ansatz ohne DNA; m – Ansatz mit einer 1:1-Mischung von Einzel- und Doppelstrang-Plasmid-DNA

Auf dem Coomassie-gefärbten PAA-Gel der Aufreinigung ist zu erkennen, dass hier weniger Protein aufgereinigt wurde als bei der Aufreinigung von MCM8 (Abb. 3.6 A). Dies lässt den Schluss zu, dass bei der Aufreinigung von MCM8 andere Proteine aus dem Zellextrakt unspezifisch mit MCM8 interagieren und so mit aufgereinigt werden. MCM8 konnte erwartungsgemäß nicht nachgewiesen werden (Abb. 3.6 B). Jedoch kann auch hier ATP-Hydrolyse beobachtet werden: Das aufgereinigte Protein aus Fraktionen Nr. 3-7 (Abb. 3.6 A) zeigt ohne DNA eine ATP-Hydrolyse von 2-5%. In Gegenwart einer Mischung aus Einzel- und Doppelstrang-Plasmid-DNA ist hier die ATP-Hydrolyse auf 12-41% erhöht. Die Fraktionen Nr. 10 und Nr. 11 weisen annähernd keine ATPase-Aktivität auf (Abb. 3.6 C).

Die hier gezeigten Ergebnisse weisen darauf hin, dass bei der sehr geringen Menge an löslichem MCM8 eine Aussage über die Aktivität des Proteins nicht möglich ist, da der Aktivitätstest durch die Gegenwart von kontaminierenden ATPase-aktiven Proteinen zu stark beeinträchtigt wird.

Eine Aufreinigung von unlöslichem H6_MCM8 aus Inklusionskörpern unter denaturierenden Bedingungen sollte zeigen, ob hierdurch die Ausbeute des rekombinanten Proteins erhöht werden kann. Anschließend wurde überprüft, ob es möglich ist, das denaturierte Protein durch Rückfaltung in seine native Struktur zu überführen.

3.1.3. Aufreinigung von denaturiertem H6_MCM8 und Rückfaltung

3.1.3.1. Aufreinigung

H6_MCM8 wurde in *E. coli* BL 21 (DE3) CodonPlus bei 37°C exprimiert. Aus der unlöslichen Fraktion des Zellextraktes wurden H6_MCM8 enthaltende Inklusionskörper mit Harnstoff-haltigem Puffer aufgeschlossen und das denaturierte Protein mittels Protino-Ni-IDA-Chromatographie unter denaturierenden Bedingungen aufgereinigt.

Hier konnte eine Ausbeute von rekombinantem MCM8 von 12 mg/l Zellkultur erreicht werden. Die Fraktionen enthalten zusätzlich zum Volllängen-Protein auch das ca. 50 kDa große N-terminales Abbauprodukt von H6_MCM8 (Abb. 3.7). Die Identifizierung des Volllängenproteins sowie des Abbauproduktes erfolgte mittels Western-Blot-Analyse, der immunchemische Nachweis von H6_MCM8 erfolgte mittels α -His6-Antikörper aus der Maus und AP-gekoppeltem Antikörper gegen Maus (Daten nicht gezeigt). Weder die Verwendung eines pH-Gradienten zur Elution von H6_MCM8 bei der Protino-Ni-IDA-Chromatographie noch ein zweiter Aufreinigungsschritte mittels EMD-SO₃⁻-Chromatographie führte zu der gewünschten Trennung des Volllängenproteins von den Abbauprodukten oder den kontaminierenden Proteinen, weshalb auf einen weiteren Aufreinigungsschritt verzichtet wurde (Daten nicht gezeigt). Die H6_MCM8-haltigen Fraktionen wurden vereinigt und durch Ultrafiltration in Vivaspin-Säulen (MWCO 10kDa) aufkonzentriert. Das noch enthaltene Imidazol wurde mit einem Puffer (25 mM Natriumphosphat pH 7, 150 mM NaCl und 8M Harnstoff) ausgewaschen. Für den Rückfaltungs-Screen wurde die Proteinkonzentration auf 5 mg/ml eingestellt.

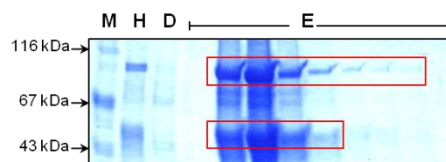


Abb. 3.7 Aufreinigung von H6_MCM8 unter denaturierenden Bedingungen

SDS-PAGE-Analyse des mittels Protino-Ni-IDA - Chromatographie aufgereinigten H6_MCM8 auf einem 9%igen PAA-Gel mit anschließender Coomassie-Färbung. M – Molekulargewichtsstandard; H – Harnstoffextrakt (Säulenauftrag); D – Säulendurchbruch; E - Elutionsfraktionen. Rot markiert sind die Fraktionen, die H6_MCM8 (ca. 100 kDa) oder sein N-terminales Fragment (ca. 50 kDa) enthalten.

3.1.3.2. Rückfaltung

Um geeignete Pufferbedingungen zur nativen Rückfaltung von denaturiertem MCM8 zu ermitteln, wurde entsprechend des Rückfaltungs-Screens nach Vincentelli (Vincentelli *et al.*, 2004) vorgegangen. Mit dieser Methode werden in 96-Well-Platten 80 verschiedene Pufferbedingungen getestet. Die Rückfaltungspuffer von Vincentelli decken einen pH-Bereich von 4-9 ab und enthalten Salze in Form von NaCl und KCl. Des Weiteren verhindern Glycerin oder PEG die Ausbildung

unerwünschter hydrophober Wechselwirkungen zwischen einzelnen Proteinmolekülen während der Rückfaltung. Als Aggregationsinhibitoren werden Nicht-detergente Sulfobetaine (NDSBs) zugesetzt, als Reduktionsmittel dient 2-Mercaptoethanol. Weitere hier verwendete Additive sind Arginin, Glucose, EDTA sowie ein „Cocktail“ aus NADH, Thiamin-HCl, Biotin, CaCl₂, MgCl₂, CuSO₄, ZnCl₂, CoSO₄, ADP, und NiCl₂. Tab. 3.2 zeigt die Verteilung der getesteten Rückfaltungspuffer (Vincentelli *et al.*, 2004) in einer 96-Well-Platte. Zusätzlich wurde im gleichen Format ein Puffer getestet, der bereits erfolgreich zur Rückfaltung eines N-terminalen Fragments von *Xenopus* MCM8 verwendet wurde (Maiorano *et al.*, 2005).

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
A	2-ME, Arg	2-ME, KCl, NDSB256	200 mM NaCl	KCl, Glucose	KCl		NDSB201, Arg	2-ME, KCl, NDSB201, Arg	2-ME	Glycerin, NDSB201
B	2-ME, NDSB256	2-ME, NDSB201, Glucose	NDSB256	„Cocktail“	NSB256, Glucose	KCl	2-ME, PEG4000	Glucose	NDSB201	100 mM NaCl, Glucose
C	2-ME, 100 mM NaCl	KCl, NDSB195	2-ME, EDTA, NDSB201	2-ME, PEG400, NDSB201	2-ME, Glycerin	200 mM NaCl, NDSB201	NDSB195, Glucose		2-ME, PEG4000, Glucose	2-ME, NDSB195, Arg
D	Glycerin	PEG4000, Glucose	2-ME, Glycerin	2-ME, NDSB195, Glucose	EDTA	2-ME, Glycerin	2-ME, EDTA, NDSB195	PEG4000, NDSB195	2-ME, KCl, NDSB201, Glucose	PEG400
E	PEG400, Glucose	EDTA, Arg	2-ME, PEG400, Arg	Glycerin, NDSB256, Arg	2-ME, 100 mM NaCl, NDSB195	PEG4000, NDSB256, Arg	„Cocktail“	2-ME, Glucose	2-ME	
F	EDTA	100 mM NaCl, Arg	2-ME, NDSB256	2-ME, 200 mM NaCl, Glucose		100 mM NaCl, NDSB201	Arg	2-ME, 100 mM NaCl, NDSB256	100 mM NaCl, NDSB256	2-ME, EDTA, Arg
G	NDSB201	2-ME, PEG4000, NDSB201	2-ME, Glycerin, NDSB195	2-ME, NDSB201, Arg	PEG4000	2-ME, Arg	EDTA, NDSB256, Glucose	2-ME, 200 mM NaCl, Glucose	2-ME, NDSB195	NDSB195, Arg
H	2-ME, 200 mM NaCl, NDSB195, Arg	200 mM NaCl, NDSB195	2-ME	PEG400, NDSB256	2-ME, PEG400, NDSB256, Glucose	2-ME	2-ME, Glycerin	PEG400, NDSB195	2-ME, 200 mM NaCl, NDSB256	„Cocktail“

Tab. 3.2 Schematische Darstellung der Pufferverteilung im Rückfaltungs-Screen nach Vincentelli *et al.* (2004). Farbcode der Felder: Gelb – pH4; Orange – pH5; Rot – pH6; Violett – pH7; Blau – pH8; Grün – pH9. Rot umrandet sind diejenigen Puffer, in denen nach Zugabe des Proteins die oD_{350} unter 0,05 blieb. Arg – Arginin; 2-ME – 2-Mercaptoethanol

Nach Zugabe der H6_MCM8-Proteinlösung wurde die OD_{350} der Lösung in den einzelnen Wells bestimmt. Für fast alle Wells ergab sich ein Wert über 0,05, was auf unlösliches bzw. ausgefallenes Protein schließen lässt (Vincentelli *et al.*, 2004). Lediglich in Puffern mit einem pH-Wert von 4 oder in solchen, die 0,8 M Arginin enthielten blieb H6_MCM8 löslich (Tab. 3.2, rot markiert).

3.1.3.3. Dialyse und Aktivitätsbestimmung von rückgefaltetem H6_MCM8

Das lösliche Protein aus dem Rückfaltungs-Screen (3.1.2.2) wurde auf ATPase-Aktivität untersucht. Hierfür wurden aus jedem Rückfaltungsansatz 2 μ l der Proteinlösung entsprechend 5,2 nmol H6_MCM8 entnommen und für den Aktivitätstest eingesetzt. Eine ATPase-Aktivität konnte nicht nachgewiesen werden (Daten nicht gezeigt). Wurden die entsprechenden Proben des Rückfaltungs-Screens gegen einen glycerinhaltigen Puffer (25 mM Natriumphosphat pH 7, 125 mM NaCl, 0,01% 2-Mercaptoethanol, 40% Glycerin) dialysiert, führte dies zur Präzipitation des Proteins (Daten nicht gezeigt).

Möglicherweise blieb MCM8 in den Puffern mit einem pH-Wert von 4 aufgrund einer drastischen Änderung seiner Eigenladung löslich, wodurch eine Aggregation des Proteins verhindert wurde. Arginin wirkt ebenfalls aggregationshemmend, wobei der genaue Wirkmechanismus nicht bekannt ist (Liu *et al.*, 2007; Shah *et al.*, 2011). Es ist wahrscheinlich, dass MCM8 aufgrund seiner Größe und einer möglicherweise komplizierten Domänenstruktur nur schwer rückgefaltet werden kann und deshalb die Gewinnung von nativ gefaltetem Protein unter den getesteten Bedingungen nicht möglich ist.

Um eine größere Menge an löslichem Protein in *E. coli* zu erhalten und so die Qualität der Aufreinigung zu verbessern, wurde im Folgenden die Expression von MCM8 in Gegenwart von Chaperonen durchgeführt.

3.1.4. Co-Expression von MCM8 und Chaperonen in *E. coli* BI21 (DE3)

Die Löslichkeit sowie die Funktion eines Proteins werden durch seine Tertiärstruktur bzw. Quartärstruktur bestimmt, das heißt nur die korrekt gefaltete "native" Struktur besitzt die für die biologische Aktivität eines Proteins wichtigen aktiven Zentren und Substratbindungsstellen. Eine hohe Expressionsrate kann zu einem erhöhten Anteil an Missfaltung und Aggregation führen. Um dem entgegenzuwirken, können Chaperone zusammen mit den rekombinanten Proteinen co-exprimiert werden, was zu einer verbesserten Löslichkeit der exprimierten Proteine führen kann (Bukau *et al.*, 2006; Mogk, 2001). Chaperone fungieren in der Zelle als ‚Faltungshelfer‘: Zytoplasmatische Proteine werden während und nach ihrer Synthese von Chaperonen gebunden, die hierdurch ‚unerlaubte‘ intermolekulare Wechselwirkungen verhindern. Im Zytoplasma von *E. coli* können vier große Chaperonsysteme unterschieden werden. Der Ribosom-assoziierte Triggerfaktor unterstützt die Faltung der neusynthetisierten Polypeptidkette durch eine starke verminderte Faltungsgeschwindigkeit (Agashe *et al.*, 2004). DnaK, dessen Cofaktor DnaJ und der Nukleotid-Austausch-Faktor GrpE erkennen Polypeptidketten in ihrer gestreckten Konformation und verhindern deren Aggregation (Langer *et al.*, 1992). GroEL und GroES unterstützen die Faltung von kompakten Faltungsintermediaten, die hydrophobe Oberflächen exponieren (Li *et al.*, 2009; Li *et al.*, 2010). Clp-ATPasen als ein Teil der Degradationsmaschinerie können Proteine entfalten und Proteinaggregate auflösen (Gottesman, 1996; Hartl & Hayer-Hartl, 2002).

Zur Co-Expression von verschiedenen MCM8-Varianten mit Chaperonen wurden die fünf Chaperon-kodierenden Vektoren pGro7, pKJE7, pGKJE8, pTf16 oder pGTf2 getestet. Die Vektoren kodieren für verschieden Kombinationen der Chaperone DnaK, DnaJ, GrpE, GroEL und GroES sowie den *E. coli* Triggerfaktor. Als Expressionsstamm wurde hier *E. coli* BI21 (DE3) gewählt, da *E. coli* BI21 (DE3) CodonPlus wie die Chaperon-kodierenden Plasmide eine Chloramphenicol-Resistenz trägt und somit die Verwendung dieses Stammes nicht möglich ist. Für die Co-Expression von H6_MCM8 mit Chaperonen wurden verschiedene Expressionstemperaturen getestet.

Lösliches H6_MCM8 konnte für die Expression bei Raumtemperatur sowie bei 15° C mit gleichzeitiger Expression der Chaperon-Kombinationen GroES/GroEL (Plasmid pGro7), DnaK/DnaJ/GrpE + GroES/GroEL (Plasmid pG-KJE8) sowie des *E. coli* Triggerfaktors (Plasmid pTf16) beobachtet werden. Zusätzlich ergab sich bei einer Expressionstemperatur von 15° C und der Co-Expression der Chaperon-Kombination DnaK/DnaJ/GrpE (Plasmid pKJE7) lösliches H6_MCM8 (Abb. 3.8). Das beste Verhältnis von löslichem zu unlöslichem Vollängen-Protein wurde in der Co-Expression mit *E.coli* Trigger Faktor erreicht (Abb. 3.8, rot markiert). Auch wurde hier eine verminderte Menge des Abbauproduktes detektiert. Dies kann darauf zurückzuführen sein, dass bei 15 °C Proteasen weniger aktiv sind als bei höheren Temperaturen. Für die folgenden Expressionen von MCM8 wurde daher eine Expressionstemperatur von 15 °C bei gleichzeitiger Expression des *E. coli* Triggerfaktors gewählt.

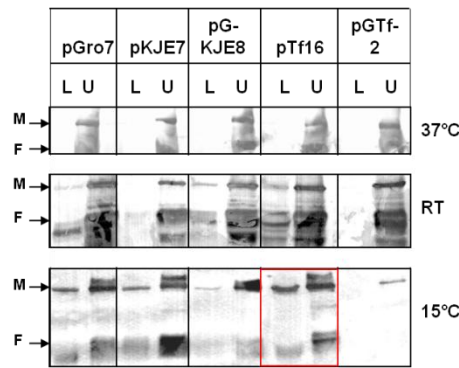


Abb. 3.8 Expression von H6_MCM8 bei gleichzeitiger Expression von Chaperonen

E. coli BL21 (DE3) wurde mit den entsprechenden Plasmiden (pET_H6_MCM8 Iso1 und jeweils pGro7, pKJE7, pGKJE8, pTf16 oder pGTf2) co-transformiert, bei verschiedenen Temperaturen kultiviert und die Zellextrakte auf einem 9%igen (15°C), 10%igen (RT) bzw. 13,3%igen (37°C) PAA-Gel mit anschließendem Western-Blot analysiert. Der immunchemische Nachweis von H6_MCM8 erfolgte mittels α -His6-Antikörper aus der Maus und AP-gekoppeltem Antikörper gegen Maus.

L – lösliches Protein aus Zellextrakt; U – unlösliches Protein aus Harnstoff-Extrakt; M – H6_MCM8 (Volllänge) F – N-terminales Fragment von H6_MCM8 (ca. 50 kDa). Rot markiert ist die Bedingung, bei denen das beste Verhältnis von löslichem Volllängen-Protein zu unlöslichem Protein und N-terminalem Proteolysefragment erreicht wurde.

3.1.4.1. Untersuchung von H6_MCM8, MCM8_H6 und MCM8_H6 K460E nach Co-Expression von *E. coli* Triggerfaktor

Die Expression von H6_MCM8 wurde in *E. coli* BL 21 (DE3) pTf16 durchgeführt. Der erste Schritt der Aufreinigung erfolgte mittels Talon-Chromatographie. Hier konnte beobachtet werden, dass ein großer Anteil von H6_MCM8 im Säulendurchbruch zu finden war (Daten nicht gezeigt). Dies könnte darauf hinweisen, dass unter nativen Bedingungen der N-terminale His-Tag teilweise im Inneren des Proteins verborgen ist und nicht mit dem Säulenmaterial interagiert. In einem zweiten Aufreinigungsschritt wurde das vorgereinigte Protein mittels Heparin-Chromatographie weiter aufgereinigt und mittels SDS-Page und Western-Blot analysiert (Abb.3.9 A+B).

Es ist deutlich zu erkennen, dass hier die Ausbeute an H6_MCM8 wesentlich höher ist, als ohne die Co-Expression des *E. coli* Triggerfaktors (Kap. 3.1.3). Außerdem zeigten sich hier kaum noch Kontaminationen durch andere Proteine. Zusätzlich zum Volllängenprotein wurde auch hier N-terminales Abbauprodukt von MCM8 aufgereinigt (Abb. 3.9 A+B), was eine Bestimmung der tatsächlichen Ausbeute an Volllängenprotein erschwerte.

Zur Überprüfung der Aktivität von H6_MCM8 wurde die ATPase-Aktivität aller Elutionsfraktionen der Heparin-Chromatographie in Gegenwart einer Mischung von Einzel- und Doppelstrang-DNA sowie ohne DNA bestimmt. In den Fraktionen 12 – 15 wird die höchste ATPase-Aktivität detektiert, hier wird ohne DNA bereits 34 - 58% des vorhandenen ATPs hydrolysiert. In Gegenwart einer Mischung aus Einzel- und Doppelstrang-Plasmid-DNA ergibt sich eine ATP-Hydrolyse von 44 - 60%. Das Elutionsprofil von H6_MCM8 erstreckt sich über die Fraktionen 14 – 22 (Abb. 3.9 A+B rot markiert), wobei das meiste rekombinante Protein in den Fraktionen 16 - 19 zu finden ist.

Auch hier kann die ATPase-Aktivität nicht eindeutig MCM8 zugeordnet werden, da die Fraktionen mit der höchsten ATPase-Aktivität nicht mit den H6_MCM8-enhaltenden Fraktionen übereinstimmen (Abb. 3.9 C+D). Zudem wird eine hohe ATPase-Aktivität in Fraktionen 10 - 13 beobachtet, die kein H6_MCM8 enthalten, wohingegen die H6_MCM8-haltigen Fraktionen 21 + 22 kaum Aktivität aufweisen.

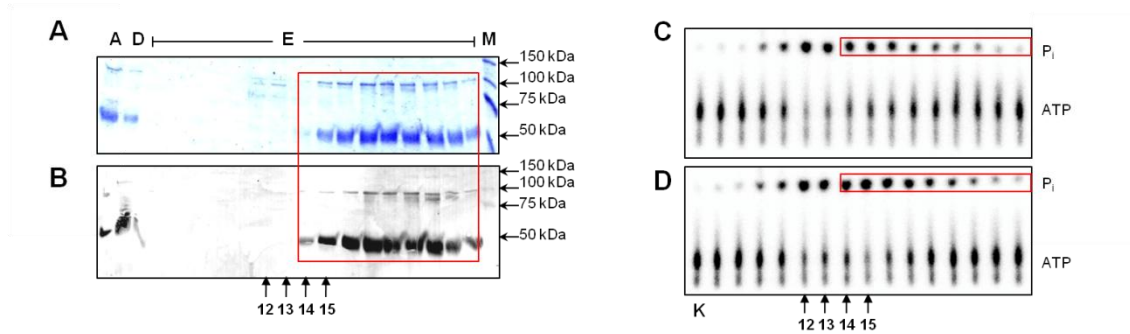


Abb. 3.9 Aufreinigung und Aktivität von H6_MCM8 nach gleichzeitiger Expression von *E.coli* Triggerfaktor

A+B: SDS-PAGE-Analyse des mittels Talon- und Heparin- Chromatographie aufgereinigten H6_MCM8 auf einem 9%igen PAA-Gel. Im Anschluss an die Elektrophorese wurden die Gele mit Coomassie gefärbt (A) bzw. im Western-Blot analysiert (B). Der immunochemische Nachweis von H6_MCM8 erfolgte mittels α -His6-Antikörper aus der Maus und AP-gekoppeltem Antikörper gegen Maus. M – Molekulargewichtsstandard; A – Säulenauftrag; D – Säulendurchbruch; E – Elutionsfraktionen. Rot markiert sind die Fraktionen, die H6_MCM8 (ca. 100 kDa) oder sein N-terminales Fragment (ca. 50 kDa) enthalten.

C+D: Repräsentative DC der ATPase-Reaktion der Elutionsfraktionen aus A+B. 1 μ l Protein, 1,8 nM γ -[³²P]-ATP ohne DNA (C) bzw. mit 0,4 μ g einer 1:1-Mischung von Einzel- und Doppelstrang-Plasmid-DNA (D) in NEB4 wurden für 120 min bei 37°C inkubiert. K – Kontrollansatz Puffer ohne Protein

Wahrscheinlich ist die beobachtete Aktivität auch hier auf kontaminierendes ATPase-aktives Protein zurückzuführen. Da eine leichte Stimulation durch DNA zu erkennen ist, handelt es sich hierbei vermutlich um Proteine, deren ATPase-Aktivität durch die Anwesenheit von DNA stimuliert wird. Des Weiteren besteht die Möglichkeit, dass die ATPase-Aktivität von H6_MCM8 durch das mit aufgereinigte Abbauprodukt gehemmt wird. Wie für die anderen MCM-Proteine gezeigt, ist zur Entwicklung vollständiger ATPase-Aktivität eine Hexamerisierung des Proteins notwendig (Bochman & Schwacha, 2007; Davey *et al.*, 2003; Kasiviswanathan *et al.*, 2004; Ma *et al.*, 2010). Gleiches gilt vermutlich auch für MCM8. Interaktion eines nicht funktionalen Abbauproduktes mit aktivem Volllängenprotein könnte diese Hexamerisierung verhindern und so die ATPase-Aktivität stören.

Ein C-terminal His-getaggttes MCM8-Konstrukt sollte zeigen, ob dieses ohne Abbauprodukt aufgereinigt werden kann.

MCM8_H6 wurde in *E. coli* BL 21 (DE3) pTf16 exprimiert und mittels Talon- und Heparin-Chromatographie aufgereinigt und anschließend mittels SDS-PAGE und Western-Blot analysiert (Abb. 3.10 A+B). Die C-terminal His-getaggtten MCM8-Variante kann wie H6_MCM8 mit hoher Reinheit aufgereinigt werden. Auch hier konnte ein Abbauprodukt (ca. 75 kDa) detektiert werden. Im Vergleich zu der N-terminal His-getaggtten Variante erschien die Menge des Abbauproduktes geringer.

Ein Vergleich der Proteolysefragmente beider MCM8-Varianten lässt den Schluss zu, dass MCM8 in *E. coli* durch proteolytischen Abbau ungefähr in der Mitte des Proteins geschnitten wird. Das unterschiedliche Laufverhalten der beiden Fragmente im PAA-Gel ist vermutlich auf die

unterschiedliche Ladungsverteilung innerhalb der Aminosäuresequenz zurückzuführen. Es kann jedoch davon ausgegangen werden, dass es sich bei der Schnittstelle vermutlich um einen exponierten Bereich des Proteins kurz vor der MCM-Domäne handelt (Kap 1.3.3). Eine genauere Aussage über die Schnittstelle kann nicht gefällt werden, da die genaue Größe der Fragmente nicht bekannt ist. Hierdurch ergeben sich zwei Fragmente, von denen jeweils das His-getaggte Fragment zusammen mit dem Volllängenprotein aufgereinigt wird.

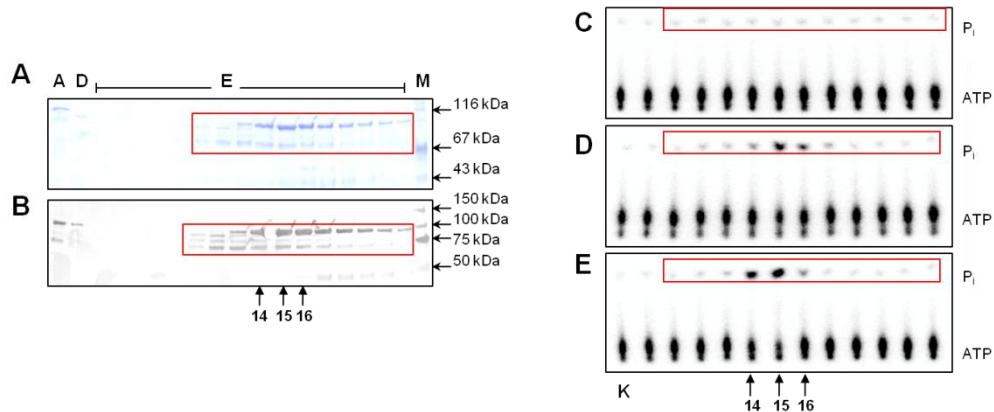


Abb. 3.10 Aufreinigung und Aktivität von MCM8_H6 nach gleichzeitiger Expression von *E.coli* Triggerfaktor
A+B: SDS-PAGE-Analyse des mittels Talon- und Heparin-Chromatographie MCM8_H6 auf einem 9%igen PAA-Gel. Im Anschluss an die Elektrophorese wurden die Gele mit Coomassie gefärbt (A) bzw. im Western-Blot analysiert (B). Der immunchemische Nachweis von MCM8_H6 erfolgte mittels α -His6-Antikörper aus der Maus und AP-gekoppeltem Antikörper gegen Maus. M – Molekulargewichtsstandard; A – Säulenauftrag; D – Säulendurchbruch; E – Elutionsfraktionen. Rot markiert sind die Fraktionen, die H6_MCM8 (ca. 100 kDa) oder sein N-terminales Fragment (ca. 75 kDa) enthalten.
C-E: Repräsentative DC der ATPase-Reaktion der Elutionsfraktionen aus A+B. 1 μ l Protein (Fraktionen jeweils 1:5 mit Puffer A der Heparin-Chromatographie verdünnt) und 2,0 nM γ - 32 P-ATP ohne DNA (C) bzw. mit 0,2 μ g einer 1:1-Mischung von Einzel- und Doppelstrang-Oligonukleotid-DNA (D) oder -Plasmid-DNA (E) in NEB4-Puffer + BSA wurden für 50 min bei 37°C inkubiert. Pfeile markieren Fraktionen mit erhöhter ATPase-Aktivität. K – Kontrollansatz Puffer ohne Protein

Für den ATPase-Aktivitätstest wurden die Elutionsfraktionen der Heparin-Chromatographie von MCM8_H6 mit dem salzfreien Waschpuffer der Heparin-Chromatographie um den Faktor 1:5 verdünnt. Da MCM8 in den Elutionsfraktionen in großem Überschuss vorliegt, sollte so die ATPase-Aktivität MCM8 zugeordnet werden können. Hier zeigt sich insgesamt eine deutlich niedrigere ATPase-Aktivität als bei der N-terminal His-getaggten Variante (Abb. 3.10 C). Eine ATPase-Aktivität ohne DNA wird hier nicht beobachtet (Abb. 3.10 C). In Gegenwart einer Mischung aus Einzel- und Doppelstrang-Oligonukleotid-DNA kann nur für die Fraktionen 14 - 16 eine ATP-Hydrolyse von 8 - 26% beobachtet werden (Abb. 3.10 D+E). In Gegenwart einer Mischung aus Einzel- und Doppelstrang-Plasmid-DNA wird ebenfalls nur für die Fraktionen 14 - 16 eine ATP-Hydrolyse von 10 - 46% detektiert (Abb. 3.10 D+E). Das Elutionsprofil von MCM8_H6 erstreckt sich über die Fraktionen 13 – 21 (Abb. 3.10 A+B). Es erscheint unwahrscheinlich, dass die beobachtete Aktivität MCM8_H6 zuzuordnen ist, da einige MCM8-enthaltende Fraktionen hier keine Aktivität aufweisen. Diese Ergebnisse weisen möglicherweise darauf hin, dass die zusätzlich aufgereinigten 75 kDa-Fragmente von MCM8_H6 die Aktivität des Volllängen-Proteins in höherem Maße einschränken als die 50 kDa-Fragmente von H6_MCM8. Es wäre ebenfalls denkbar, dass der C-terminale His-tag eine funktionale Einschränkung des Proteins bedingt.

Die insgesamt vergleichsweise niedrigere ATPase-Aktivität ist zum einen auf die Verdünnung des Proteins zurückzuführen. Andererseits ist möglicherweise während der Aufreinigung von MCM8_H6 weniger ATPase-aktives kontaminierendes Protein zusätzlich aufgereinigt worden.

Auch hier sollte eine Untersuchung der putativ Walker-A-Motiv-defekten Mutante MCM8_H6 Aufschluss darüber geben, ob die detektierte ATPase-Aktivität auf kontaminierendes Protein zurückzuführen ist.

MCM8_H6 K460E wurde analog dem rekombinanten Wildtyp-Protein exprimiert und aufgereinigt und mittels SDS-PAGE und Western-Blot analysiert (Abb. 3.11 A+B). Für die Überprüfung der ATPase-Aktivität wurden die Elutionsfraktionen hier ebenfalls um den Faktor 1:5 verdünnt. Ohne DNA sowie in Gegenwart einer Mischung aus Einzel- und Doppelstrang-Plasmid-DNA wurde keine ATPase-Aktivität beobachtet (Abb. 3.10 C+E). In Gegenwart einer Mischung aus Einzel- und Doppelstrang-Oligonukleotid-DNA zeigt sich hier in einer Fraktion eine ATPase-Aktivität von 24% (Abb. 3.11 D). Da von MCM8_H6 K460E keine solche Aktivität erwartet wird, ist auch hier die ATPase-Aktivität wahrscheinlich auf kontaminierendes Protein zurückzuführen.

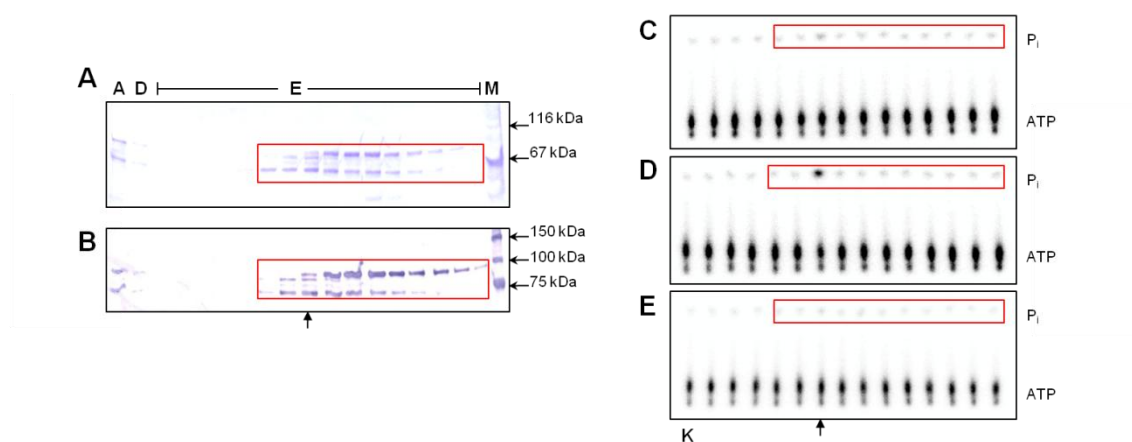


Abb. 3.11 Aufreinigung und Aktivität von MCM8_H6 K460E nach gleichzeitiger Expression von *E.coli* Triggerfaktor

A+B: SDS-PAGE-Analyse des mittels Talon- und Heparin- Chromatographie aufgereinigten MCM8_H6 K460E auf einem 9%igen PAA-Gel. Im Anschluss an die Elektrophorese wurden die Gele mit Coomassie gefärbt (A) bzw. im Western-Blot analysiert (B). Der immunchemische Nachweis von MCM8_H6 K460E erfolgte mittels α -His6-Antikörper aus der Maus und AP-gekoppeltem Antikörper gegen Maus. M – Molekulargewichtsstandard; A – Säulenauftrag; D – Säulendurchbruch; E - Elutionsfraktionen. Rot markiert sind die Fraktionen, die H6_MCM8 (ca. 100 kDa) oder sein N-terminales Fragment (ca. 75 kDa) enthalten.

C-E: Repräsentative DC der ATPase-Reaktion der Elutionsfraktionen aus A+B. 1 μ l Protein (Fraktionen jeweils 1:5 mit Puffer A der Heparin-Chromatographie verdünnt) und 2,0 nM γ -[32 P]-ATP ohne DNA (C) bzw. mit 0,2 μ g einer 1:1-Mischung von Einzel- und Doppelstrang-Oligonukleotid-DNA (D) oder -Plasmid-DNA (E) in NEB4-Puffer + BSA wurden für 50 min bei 37°C inkubiert. Pfeile markieren Fraktionen mit erhöhter ATPase-Aktivität. K – Kontrollansatz Puffer ohne Protein

Um eine potenziell inhibierende Wirkung des Proteolysefragments auf die ATPase-Aktivität von MCM8 zu untersuchen, wurde im Folgenden versucht das Proteolysefragment mittels Glyceringradientenzentrifugation vom Volllängenprotein abzutrennen.

3.1.4.2. Glyceringradienten-Zentrifugation von H6_MCM8

Durch die Zentrifugation in einem Glyceringradienten werden Proteine mit geringem Verdünnungseffekt ihrer Masse nach aufgetrennt. Große Proteine und Proteinkomplexe wandern aufgrund ihrer größeren Masse bzw. ihres höheren Sedimentationskoeffizienten schneller im Gradienten als kleine. Hier sollte überprüft werden, ob es möglich ist, H6_MCM8 von seinen Abbruchfragmenten sowie möglicher anderer kontaminierender Proteine zu trennen. Durch dieses Verfahren können auch mögliche Multimere von MCM8 nachgewiesen werden.

H6_MCM8 wurde in *E. coli* BL 21 (DE3) pTf2 pET_MCM8_H6 bei 15°C exprimiert und mittels Talon und Heparin-Chromatographie aufgereinigt. H6_MCM8-haltige Fraktionen wurden auf einen Glyceringradienten (17 - 34%) aufgetragen. Nach einer Zentrifugation bei 20000 rpm für 16 Stunden wurde der Gradient fraktioniert und mittels SDS-PAGE und Western-Blot analysiert. Eine Trennung von H6_MCM8 von seinem Proteolysefragment oder von anderen kontaminierenden Proteinen konnte nicht erreicht werden (Daten nicht gezeigt). Dies lässt den Schluss zu, dass vermutlich eine Interaktion bzw. Aggregation von Vollängenprotein und Proteolysefragment bzw. kontaminierendem Protein stattfindet. Die PAA-Gel-Analyse sowie eine spektralphotometrische Analyse lieferten keinen Hinweis auf die erwartete Hexamerisierung. Die Hexamerisierung von MCM2-7 kann durch ATP stimuliert werden (Bochman & Schwacha, 2008). Jedoch auch nach Ultrazentrifugation in Gegenwart von ATP konnte kein multimeres MCM8 identifiziert werden (Daten nicht gezeigt). Eine Überprüfung der ATPase-Aktivität von H6_MCM8 sowie H6_MCM8 K460E zeigte auch nach der Glyceringradientenzentrifugation keinen deutlichen Unterschied zwischen der Aktivität von Wildtyp im Vergleich zur Walker-A-Motiv-defekten Mutante. Ebenso konnte die Aktivität nicht eindeutig H6_MCM8 zugeordnet werden (Daten nicht gezeigt).

3.1.4.3. Entfernung des His-Tags von H6_MCM8 durch Thrombin-Verdau

Um auszuschließen, dass die Anwesenheit eines His-Tags die Hexamerisierung verhindert oder das aktive Zentrum stört und somit die Aktivität von MCM8 einschränkt, wurde im Folgenden der His-Tag durch einen Thrombin-Verdau entfernt. Bei H6_MCM8 ist durch die Klonierung in den Expressionsvektor pET28c zwischen dem His-Tag und der MCM8-kodierenden Sequenz eine Thrombinschnittstelle eingefügt. Daher war es möglich, bei dieser Variante den His-Tag durch Verdau des Proteins mit Thrombin zu entfernen.

Hierfür wurde H6_MCM8 in *E. coli* BL 21 (DE3) pTf2 bei 15°C exprimiert, mittels Talon- und Heparin-Chromatographie gereinigt und anschließend mit Thrombin verdaut. Die Effizienz des Verdaus wurde durch die Spaltung eines Kontrollproteins unter gleichen Pufferbedingungen in einem separaten Ansatz bestätigt (Abb. 3.12 A Spur B). Anschließend wurde die ATPase-Aktivität des verdauten MCM8 sowie der Kontrollansätze durch Spaltung von $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{-ATP}$ überprüft. Eine erhöhte Aktivität von MCM8 ohne His-Tag im Vergleich zu dem unverdauten Protein konnte nicht beobachtet werden (Abb. 3.12 B+C).

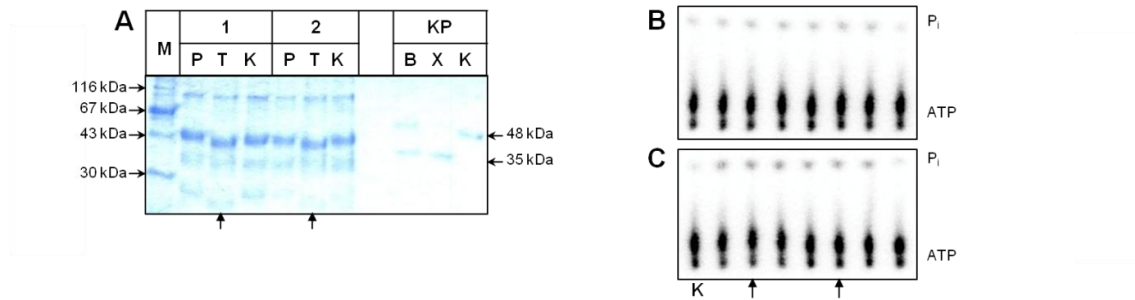


Abb. 3.12 Entfernung des N-terminalen His-Tags von H6_MCM8 durch Thrombin-Verdau.

A: SDS-PAGE-Analyse auf einem 13,3%igen PAA-Gel mit anschließender Coomassie-Färbung.

M – Molekulargewichtsstandard; 1, 2 – H6_MCM8-haltige Fraktionen aus Heparin-Chromatographie; KP – Kontrollprotein (48 kDa); P – unbehandeltes H6_MCM8; T – H6_MCM8 geschnitten mit Thrombin; K – Kontrollansatz Protein mit Thrombin-Puffer; B – Kontrollprotein geschnitten mit Thrombin in Puffer A der Heparin-Chromatographie; X – Ansatz Kontrollprotein geschnitten mit Thrombin in H₂O.

B+C: Repräsentative DC der ATPase-Reaktion der MCM8-Verdauansätze aus A. 1 µl Protein und 2,0 nM γ -[³²P]-ATP ohne DNA (C) bzw. mit 0,2 µg einer 1:1-Mischung von Einzel- und Doppelstrang-Oligonukleotid-DNA (C) in Ishimi-Puffer wurden für 50 min bei 37°C inkubiert. Die Ansätze mit verdautem H6_MCM8 sind mit Pfeilen markiert. K – Kontrollansatz Puffer ohne Protein

Diese Ergebnisse lassen darauf schließen, dass die fehlende Aktivität von MCM8 vermutlich nicht auf das Vorhandensein eines His-Tags zurückzuführen ist.

Da zur Entfaltung der kompletten Aktivität von MCM8 vermutlich eine Hexamerisierung notwendig ist, wurde im Folgenden untersucht, ob die im ATPase-Assay zur Verfügung stehende ATP-Konzentration von 2 nM für eine Hexamerisierung von MCM8 ausreichend ist.

3.1.4.4. Untersuchung einer möglichen positiven Kooperativität von H6_MCM8 im Bezug auf ATP

Für die homohexameren MCM-Proteine sowie für den heterohexameren Komplex MCM2-7 wurde gezeigt, dass bei diesen zur Hydrolyse von ATP die Multimerisierung von mindestens zwei Untereinheiten erforderlich ist (Bochman & Schwacha, 2008; Ishimi, 1997; Shechter *et al.*, 2000; You *et al.*, 2002). Des Weiteren erfordert eine Multimerisierung die Bindung von ATP oder ADP (Bochman & Schwacha, 2007; Davey *et al.*, 2003; Ma *et al.*, 2010). Außerdem wurde gezeigt, dass zur Entwindung von DNA ATP-Hydrolyse erforderlich ist (Chong *et al.*, 2000; Ishimi, 1997; Kelman *et al.*, 1999; Shechter *et al.*, 2000) und dass die Affinität für ATP bei MCM2-7 durch eine Steigerung der ATP-Konzentration erhöht werden kann (Schwacha & Bell, 2001). MCM8 weist eine hohe Ähnlichkeit in der Domänenstruktur mit den anderen MCM-Proteinen auf, was darauf schließen lässt, dass auch MCM8 zur ATP-Hydrolyse multimerisieren muss. Möglicherweise sind die im ATPase-Assay verwendeten γ -[³²P]-ATP-Konzentrationen (sog. ‚heißes‘ ATP) zu niedrig und die Affinität von MCM8 für ATP zu gering, so dass MCM8 keinen stabilen Hexamer bilden und anschließend DNA entwinden kann. Dies wurde durch eine Titration mit steigenden Mengen an nicht-radioaktivem („kaltem“) ATP überprüft. Im Falle einer positiven Kooperativität mehrerer MCM8-Untereinheiten erwartet man im Bereich niedriger ATP-Konzentrationen eine geringere ATP-Hydrolyserate, da ATP zunächst nur schlecht gebunden wird. Bei steigender ATP-Konzentrationen sollte MCM8 bevorzugt hexamerisieren

und durch positive Kooperativität seine Affinität zu ATP erhöhen und letztendlich in der Lage sein, DNA entwinden zu können. Dies hätte insgesamt einen sigmoidalen Kurvenverlauf für die Menge an hydrolysiertem Gesamt-ATP zur Folge. Die physiologische ATP-Konzentration in der Zelle beträgt ca. 3 mM ATP. Um zu entscheiden, ob positive Kooperativität vorliegt, wurde die ATPase-Aktivität über einen Konzentrationsbereich von 0,1-1 mM ATP getestet. In diesem Bereich sollten eine Hexamerisierung von MCM8 und eine DNA-abhängige Hydrolyse von ATP möglich sein.

H6_MCM8 wurde in *E. coli* BL 21 (DE3) pTf2 pET_H6_MCM8 bei 15°C exprimiert, mittels Talon- und Heparin-Chromatographie gereinigt und H6_MCM8-haltige Fraktionen für den Aktivitätstest eingesetzt (Abb. 3.13 D). Ein Hinweis auf positive Kooperativität von H6_MCM8 bezüglich ATP konnte nicht beobachtet werden (Abb. 3.13 A, B+C). Es wird für jede Fraktion ähnlich einer Michaelis-Menten-Kinetik ein hyperbolischer Kurvenverlauf beobachtet. Entweder besitzt MCM8 diese positive Kooperativität nicht, wie dies z.B. für die homohexameren Helikasen DnaB aus *E. coli* (Bujalowski & Klonowska, 1993) oder die Bacteriophage T7 Helikase gezeigt wurde (Donmez & Patel, 2006). Vermutlich ist jedoch auch hier die ATPase-Aktivität auf eine Kontamination zurückzuführen.

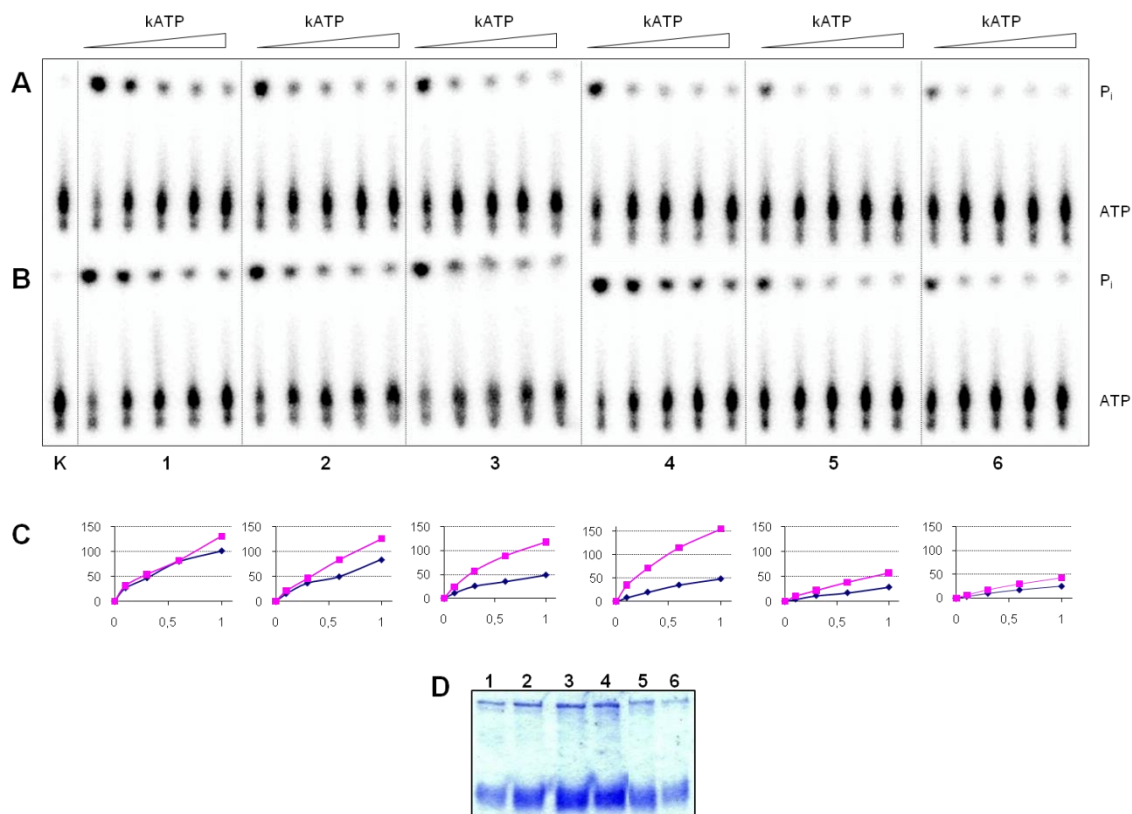


Abb. 3.13 Abklärung einer Stimulierung der ATPase-Aktivität von H6_MCM8 durch ATP

A+B: Repräsentative DC der ATPase-Reaktion von H6_MCM8. 1 μ l Protein aus Heparin-Chromatographie und 2,0 nM γ - 32 P-ATP ohne DNA (A) bzw. mit 0,2 μ g einer 1:1-Mischung von Einzel- und Doppelstrang-Oligonukleotid-DNA (B) in NEB4-Puffer wurden für 120 min bei 37°C inkubiert. Zusätzlich enthielten die Ansätze 0/ 0,1/ 0,3/ 0,6 bzw. 1 mM ‚kaltes‘ ATP (kATP); K – Kontrollansatz Puffer ohne Protein.

C: In der grafischen Auswertung wurde die Menge an kaltem ATP in mM (x-Achse) gegen die Menge an hydrolysiertem Gesamt-ATP in μ M (y-Achse) aufgetragen. Die blaue Kurve repräsentiert die Hydrolyse in Ansätzen ohne DNA, die rote Kurve repräsentiert die Hydrolyse in Gegenwart von DNA

D: SDS-PAGE-Analyse der verwendeten H6_MCM8-Fractionen mit anschließender Coomassie-Färbung

3.1.5. Zusammenfassung MCM8 aus *E. coli*

MCM8 wurde in *E. coli* in verschiedenen Varianten exprimiert. Tabelle 3.3 fasst die zur Expression getesteten *E. coli*-Stämme sowie die exprimierten MCM8-Varianten zusammen.

Stamm	MCM8-Variante	Expressions-system	Expression	Abbau	Protein löslich	Aufreinigung möglich	ATPase-Aktivität
<i>E. coli</i> BL21 (DE3) Codon Plus	H6_MCM8	pET28c	+	+++	-	-	-
	MCM8_H6	pET28c	+	+++	-	-	-
<i>E. coli</i> Rosetta 2 (DE3) pLysS	H6_MCM8	pET28c	+	+++	-		
	MCM8_H6	pET28c	+	+++	-		
<i>E. coli</i> BL21 (DE3) + Triggerfaktor	H6_MCM8	pET28c	+	+	+/-	+	-
	MCM8_H6	pET28c	+	+	+/-	+	-

Tab. 3.3 Überblick der verwendeten Bakterienstämme sowie der exprimierten Proteinvarianten.

Die Ergebnisse lassen darauf schließen, dass MCM8 in *E. coli* vermutlich nicht als funktionales Protein exprimiert werden kann. Möglich ist auch, dass der verwendete sehr sensitive Aktivitätsassay zu keinem Ergebnis führt, da MCM8 nur in speziellen Bedingungen, wie z.B. die Anwesenheit eines Partnerproteins oder eine aktivierenden posttranslationalen Modifikation aktiv ist. Möglicherweise benötigt MCM8 zusätzliche posttranslationalen Modifikationen wie die Hinzufügung spezieller funktioneller Gruppen oder Bindungen. Solche Modifikationen finden in *E. coli* nicht statt.

Um posttranslationale Modifikationen in rekombinanten eukaryotischen Proteinen zu erhalten, ist die Expression in einem eukaryotischen System erforderlich. Im Folgenden wurde daher die Expression von MCM8 in den eukaryotischen Expressionssystemen *S. cerevisiae* und in Insektenzellen untersucht.

3.2. Expression von MCM8 in *S. cerevisiae*

Eine Expression von rekombinanten eukaryotischen Proteinen in *S. cerevisiae* bietet sich an, da hier viele posttranslationale Modifikationen wie Glykosylierungen und Phosphorylierungen durchgeführt werden. Zusätzlich ähneln die Proteinprozessierungsschritte und Sekretionsmechanismen denen höherer eukaryotischer Zellen, was die korrekte Faltung der Proteine sowie die korrekte Ausbildung von Disulfidbrücken in rekombinanten eukaryotischen Proteinen fördert (Buckholz & Gleeson, 1991; Grivell & Planta, 1990). Ein weiterer Vorteil von *S. cerevisiae* ist die gut etablierte Genetik und Molekularbiologie.

Für die Expression von MCM8 in *S. cerevisiae* wurde die codierende Sequenz von H6_MCM8 aus dem Expressionsvektor pET_H6_MCM8 Iso1 in den Hefe-Expressionsvektor pEMBLyex-2 umklontiert und die korrekte Insertion durch Sequenzierung bestätigt. Die Selektion und Erhaltung dieses Shuttlevektors in *E. coli* wird durch das Ampicillin- Resistenzgen (*Amp*) und den bakteriellen Plasmidorigin *colE1* (ORI) gewährleistet. In pEMBLyex-2 steht H6_MCM8 unter der Kontrolle des durch Galaktose induzierbaren GAL-CYC-Promotors. Solange keine Proteinexpression erfolgen soll, wird als Kohlenstoffquelle Glucose verwendet. Zur Induktion der Proteinexpression werden die Hefezellen in galaktosehaltiges Minimalmedium überführt. Die Selektion und Erhaltung des Plasmids in *S. cerevisiae* wird durch die Auxotrophiemarker *leu2-d* (Bisopropylmalat-Dehydrogenase-Gen mit defektem Promoter) und *ura3* (Orotidine-5-Phosphat-Decarboxylase-Gene) und den 2 μ -ORI gewährleistet. Als Expressionsstämme wurden *S. cerevisiae* BJ1991, HT393 und 150-2B getestet.

In *S. cerevisiae* wurde beobachtet, dass nach Induktion der Proteinexpression kein weiteres Wachstum der Zellen beobachtet wurde (Daten nicht gezeigt). Zudem war keine Expression von MCM8 nachweisbar (Daten nicht gezeigt).

Die fehlende Proteinexpression in *S. cerevisiae* könnte auf eine mögliche Toxizität der rekombinanten Proteine für die Hefezellen zurückzuführen sein. *S. cerevisiae* stellt zwar ein eukaryotisches Expressionssystem zur Verfügung, jedoch besitzen die Hefen kein natürliches MCM8 (Gozuacik *et al.*, 2003). Es wäre denkbar, dass humanes rekombinantes MCM8 – soweit es in den Zellkern gelangen kann - die DNA-Replikation von *S. cerevisiae* stört.

Als ein weiteres eukaryotisches Expressionssystem, in welchem ebenfalls posttranslationale Modifikationen durchgeführt werden und welches selbst endogenes MCM8 besitzt, wurden im Folgenden Insektenzellen als Expressionssystem für MCM8 untersucht.

3.3. Expression von MCM8 in Insektenzellen

Insektenzellen sind insbesondere aufgrund der hier stattfindenden Säugetier-ähnlichen Glykosylierungen, Phosphorylierungen und Acylierungen für die Expression rekombinanter humaner Proteine geeignet. Auch die Prozessierung und der Transport der Proteine erfolgen hier ähnlich wie in Säugerzellen (Mühlhardt, 2009). Die MCM-Proteine 4,6 und 7 wurden ebenfalls bereits erfolgreich in Insektenzellen exprimiert (You *et al.*, 2002).

Zur Expression von MCM8 wurden zunächst *Sf9* Insektenzellen verwendet. *Sf9*-Zellen sind eine immortalisierte Insekten-Zelllinie aus den Ovar-Zellen der Mottenart *Spodoptera frugiperda* und werden zur Produktion von rekombinanten Proteinen eingesetzt (Smith *et al.*, 1983b; Vaughn *et al.*, 1977). Für die Expression in Insektenzellen wurde zuerst eine transiente Expression unter Verwendung des Vektor pIEx-1 (Abb. 3.14) durchgeführt, im weiteren Verlauf wurde die Expression durch die Anwendung des Baculovirussystems erhöht.

3.3.1. Transiente Expression von MCM8 in *Sf9*-Insektenzellen

3.3.1.1. Expressionssystem

Zur Expression von MCM8 in Insektenzellen wurde das MCM8-Gen in den Expressionsvektor pIEx-1 (Abb. 3.14) kloniert und mittels Transfektion in die Insektenzellen eingebracht.

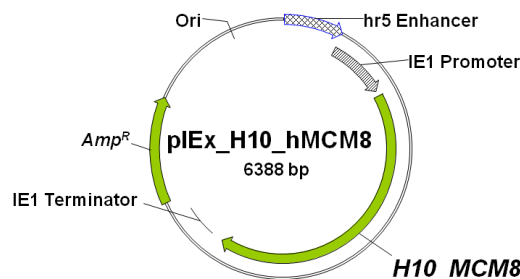


Abb. 3.14 Expressionsvektor pIEx_H10_MCM8 zur Expression von H10_MCM8 in Insektenzellen

Im Vektor pIEx1 steht das Zielgen unter der Kontrolle des *hr5*-Enhancers und des *ie5* (*immediate early*)-Promotors, einer Kombination aus den Transkriptionselementen des AcNPV (*Autographa californica nuclear polyhedrosis virus*) - Baculovirus. Diese Kombination ermöglicht eine Expression des rekombinanten Proteins durch die Transkriptionsmaschinerie der Insektenzellen direkt nach der Transfektion ohne die Notwendigkeit einer Baculovirus-Infektion.

3.3.1.2. Transfektionstests

Als Transfektionsmethoden wurden die Lipofektion durch kommerziell erhältliche Lipofektionsreagenzien (Insect GeneJuice von Novagen bzw. FuGene HD von Roche) und die Calcium-Phosphat-Methode getestet. Bei der Lipofektion wird die DNA in das Lumen unilamellarer Phospholipidvesikel eingeschlossen, welche bei Kontakt mit den Zielzellen verschmelzen (Felgner *et*

al., 1987). Die Calcium-Phosphat-Methode basiert auf der Co-Präzipitation der DNA mit Calcium-Phosphat (Graham & van der Eb, 1973). Die Präzipitate werden von den Zielzellen durch Phagocytose aufgenommen. Um die für eine erfolgreiche Transfektion einzusetzenden Mengen an DNA und an Transfektionsreagenz zu ermitteln, wurden unterschiedliche Mengen von DNA sowie Transfektionsreagenz eingesetzt und die Effektivität der Transfektion von Sf9-Zellen durch die transiente Expression von H10_eGFP überprüft (Daten nicht gezeigt).

Sf9-Insektenzellen wurden mit pLEx_H10_eGFP transfiziert und die Expression von *enhanced green fluorescent protein* (eGFP) mikroskopisch untersucht. Das Protein eGFP leuchtet grün, wenn es mit blauem oder ultraviolettem Licht bestrahlt wird. Es gibt somit zuverlässig Auskunft darüber, wie viele Zellen eines Ansatzes erfolgreich transfiziert wurden. Zur Transfektionskontrolle wurden Sf9-Zellen den für die Transfektion benötigten Reagenzien einzeln ausgesetzt. Weder die alleinige Behandlung der Insektenzellen mit dem Expressionsplasmid oder dem Transfektionsreagenz beeinträchtigte die Zellen in ihrem Wachstum noch konnten Veränderungen ihrer Morphologie unter dem Phasenkontrastmikroskop identifiziert werden. Außerdem wurden immer unbehandelte Zellen als Kontrolle mitgeführt.

Zur Bestimmung der Transfektionseffizienz des Expressionsvektors pLEx_H10_eGFP wurden die Zellen des Sichtfeldes ausgezählt und der Anteil der unter Blaulicht grün leuchtenden Zellen berechnet. Die Transfektion mittels Calcium-Phosphat ergab eine Transfektionseffizienz von ca. 4 % (Daten nicht gezeigt). Durch beide verwendeten Lipofektions-Reagenzien konnte eine Transfektionseffizienz von ca. 80% erreicht werden (Abb. 3.15, Aufnahme 72 h nach der Transfektion). Die Transfektion der Insektenzellen wurde daher in Folgenden mittels Lipofektion durchgeführt.

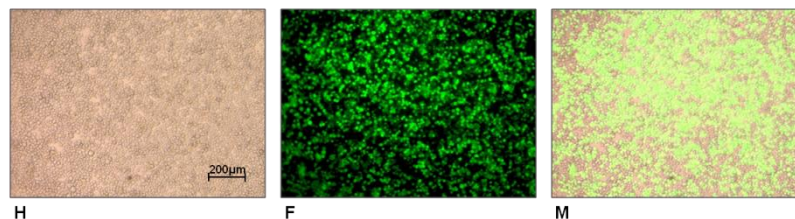


Abb. 3.15 Expression von eGFP durch Sf9 Insektenzellen nach Transfektion durch Lipofektion mit Insect GeneJuice (Novagen).

H – Geschlossener Sf9 Monolayer in Hellfeld-Aufnahme; F – Geschlossener Sf9 Monolayer in Blaulicht-Aufnahme; M – Co-Lokalisation von eGFP und Sf9 Insektenzellen in einer Überlagerung von Hellfeld- und Blaulichtaufnahme.

3.3.1.3. Bestimmung der optimalen Expressionszeit sowie der Löslichkeit von H10_MCM8

Da der Expressionsvektor pLEx_H10_MCM8 keine Selektionsmarker besitzt, handelt es sich hier um eine transiente, also eine vorübergehende Proteinexpression. Das Plasmid verbleibt extrachromosomal und besitzt keine autonome Replikationsfähigkeit. Daher geht das Plasmid durch

Abbau und Zellteilung langsam verloren und die Expression des rekombinanten Proteins findet nur über einen begrenzten Zeitraum statt. Darüber hinaus sind Sf9-Zellen nicht Protease-defizient, das heißt rekombinantes Protein in Sf9-Zellen ist proteolytischem Abbau unterworfen. Daher ist es erforderlich, den Zeitpunkt der maximalen MCM8-Expression empirisch zu bestimmen. Sf9-Zellen wurden mit pIEx_H10_MCM8 transfiziert und bei 27°C inkubiert. Über einen Zeitraum von zwei Tagen wurden alle sechs Stunden Proben genommen und auf ihren Gehalt an H10_MCM8 untersucht (Abb. 3.16).

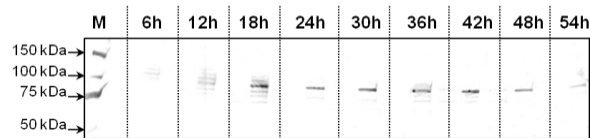


Abb. 3.16 Expression von H10_MCM8 in Sf9 Insektzellen über einen Zeitraum von 54 Stunden

Die Proteine wurden per SDS-Page auf einem 9%igen PAA-Gel mit anschließendem Western-Blot analysiert. Der immunchemische Nachweis von H10_MCM8 bzw. H10_eGFP erfolgte mittels α -His6-Antikörper aus der Maus und AP-gekoppeltem Antikörper gegen Maus. M – Molekulargewichtsstandard.

Eine Expression des rekombinanten Proteins konnte nach 12-18 Stunden nachgewiesen werden. Als optimaler Expressionszeitraum wurden 42 Stunden bestimmt, da hier die höchste Expression von H10_MCM8 detektiert wurde. Wurde die Expression über 48 Stunden hinaus durchgeführt, nahm die nachweisbare Menge an H10_MCM8 wieder ab (Abb. 3.16). Des Weiteren konnte durch eine Untersuchung des Zellextraktes sowie des Harnstoffextraktes gezeigt werden, dass das in Sf9 Insektzellen exprimierte H10_MCM8 löslich ist (Abb. 3.17). Die in *E. coli* detektierten 50 kDa - bzw. 75 kDa - Abbauprodukte von MCM8 konnten hier nicht nachgewiesen werden.

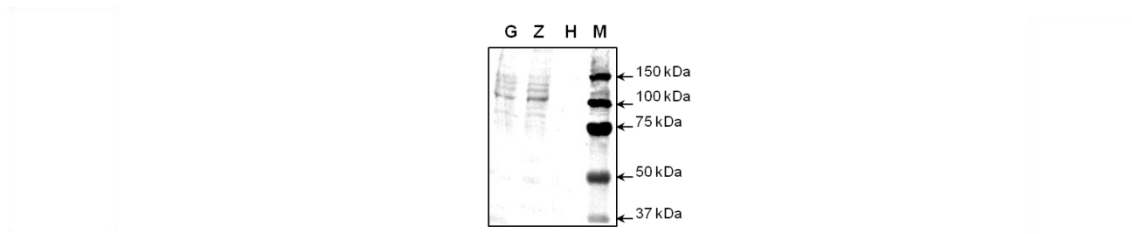


Abb. 3.17 Zellextrakte von Sf-Insektzellen nach Transfektion mit pIEx_H10_MCM8

Das Protein wurde mittels SDS-Page auf einem 9%igen PAA-Gel mit anschließendem Western-Blot analysiert. Der immunchemische Nachweis von H6_MCM8 erfolgte mittels α -His6-Antikörper aus der Maus und AP-gekoppeltem Antikörper gegen Maus. G – Gesamtzellextrakt; Z – Zellextrakt (lösliches Protein); H – Harnstoffextrakt; M – Molekulargewichtsstandard

Im Folgenden wurde das transient exprimierte rekombinante Protein aus Insektzellen aufgereinigt und dessen Aktivität durch ATPase-Reaktion untersucht.

3.3.1.4. Untersuchung von H10_MCM8 und H10_MCM8 K460E

Sf9-Insektzellen wurden jeweils in einer 10 ml - Schüttelkultur mit pIEx_H10_MCM8 bzw. pIEx_H10_MCM8 K460E transfiziert und für 42 h bei 27°C inkubiert. Anschließend wurde

H10_MCM8 aus dem Zellextrakt über Ni-NTA-Minichromatographie aufgereinigt und in drei Elutionsschritten eluiert. Rekombinantes Protein konnte nur in der ersten (K460E) bzw. in der zweiten (Wildtyp) der drei Elutionsfraktionen durch Western-Blot-Analyse nachgewiesen werden (Abb. 3.16 A). Auf einem Coomassie-gefärbten PAA-Gel konnte in den Elutionsfraktionen kein Protein detektiert werden (Daten nicht gezeigt).

Zur Überprüfung der Aktivität von H10_MCM8 aus *Sf9*-Insektzellen wurde die DNA-abhängige ATPase-Aktivität bestimmt. Um eine mögliche ATPase-Aktivität eindeutig MCM8 zuordnen zu können, wurden auch hier die putative Walker-A-Defektmutante H10_MCM8 K460E untersucht (Kap. 3.1.3). Die Untersuchung der ATPase-Reaktion von H10_MCM8 Wildtyp bzw. K460E zeigten eine geringe ATPase-Aktivität (17-28% ATP-Hydrolyse) in den ersten beiden Elutionsfraktionen beider Proteine (Abb. 3.18 B). Es wurde weder eine Stimulation der Aktivität durch DNA festgestellt, noch zeigt sich ein Unterschied in der ATPase-Aktivität der Mutanten im Vergleich zum Wildtyp-Protein (Abb. 3.18 C+D). Folglich ist die hier beobachtete Aktivität nicht auf H10_MCM8, sondern vermutlich auf unspezifisch aufgereinigte ATPasen zurückzuführen.

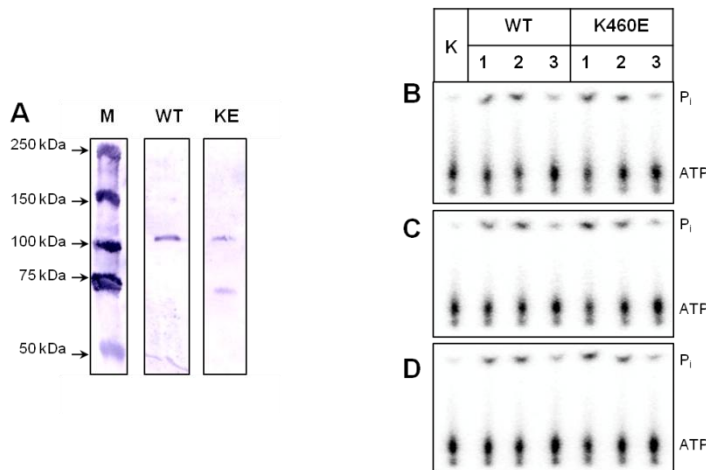


Abb. 3.18 H10_MCM8 Wildtyp bzw. K460E aus *Sf9* Insektzellen

A: Das Protein wurde aus einer 10ml-Kultur *Sf9* Insektzellen mittels Ni-NTA-Chromatographie aufgereinigt und auf einem 9%igen PAA-Gel aufgetrennt und mit Western-Blot analysiert. Der immunchemische Nachweis von H6_MCM8 erfolgte mittels α -His6-Antikörper aus der Maus und AP-gekoppeltem Antikörper gegen Maus. Abgebildet sind Elutionsfraktion Nr.2 des Wildtyp-MCM8_H10 (WT) und Elutionsfraktion Nr.1 von MCM8_H10 K460E (KE). M – Molekulargewichtsstandard

B-D: Repräsentative DC der ATPase-Reaktion der Elutionsfraktionen. Das verwendete Protein wurde je aus einer 10ml-Kultur von *Sf9* Insektzellen mittels Ni-NTA-Chromatographie aufgereinigt und dialysiert. 2 μ l Protein und 2,0 nM γ - 32 P-ATP ohne DNA (B) bzw. mit 0,2 μ g einer 1:1-Mischung von Einzel- und Doppelstrang-Oligonukleotid-DNA (C) oder – Plasmid-DNA (D) in Ishimi-Puffer wurden für 90 min bei 37°C inkubiert. K – Kontrollansatz ohne Protein; 1,2,3 – Elutionsfraktionen

Des Weiteren war es mit diesem System nicht möglich, größere Mengen von MCM8 zu exprimieren, da die Transfektionseffizienz nicht weiter gesteigert werden konnte. Zudem war hier durch die Notwendigkeit des Einsatzes eines kommerziell erhältlichen Transfektionsreagenzes die Größe der Expressionsansätze limitiert. Um eine höhere Ausbeute an rekombinantem MCM8 bei der Aufreinigung zu erreichen und eine eindeutige Aussagen über die Funktionalität des Proteins aus Insektzellen treffen zu können, war es erforderlich, die Expression des Proteins zu erhöhen und für die Expression des Proteins größere Mengen an Zellen einzusetzen. Daher wurde im Folgenden die Expression von MCM8 durch einen Baculovirus in *High Five* - Insektzellen durchgeführt.

3.3.2. Baculovirus-vermittelte Expression von MCM8 in *HiV*-Zellen

3.3.2.1. Expressionssystem

Die Expression von MCM8 durch einen Baculovirus wurde gewählt, da im Gegensatz zur Transfektion die Infektion einer größeren Mengen von Zellen und eine komplette Infektion der Kultur möglich wird. Baculoviren sind filamentöse Viren mit doppelsträngiger DNA, die zur Expression komplexer eukaryotischer Proteine in Zellkulturen verwendet werden können. Zur Generierung der Baculoviren wurde die kommerziell erworbene BacMagic Baculovirus-DNA (Novagen) verwendet. Hierbei handelt es sich um eine nicht-replizierfähige Vorstufe des AcNPV-Baculovirus.

Zur Generierung und Anzucht der rekombinanten Baculoviren wurden *Sf9*-Zellen verwendet. *Sf9*-Insektenzellen wurden mit BacMagic-DNA und einem das Zielgen enthaltenden Transfervektor pIEx/Bac-1 (Abb. 3.19 A) co-transfiziert. Durch Rekombination der BacMagic-DNA mit dem Transfervektor entsteht ein vollständiger Baculovirus, der durch die Wiederherstellung des essentiellen viralen ORF1629 die Möglichkeit erhält, zu replizieren (Abb. 3.19 B).

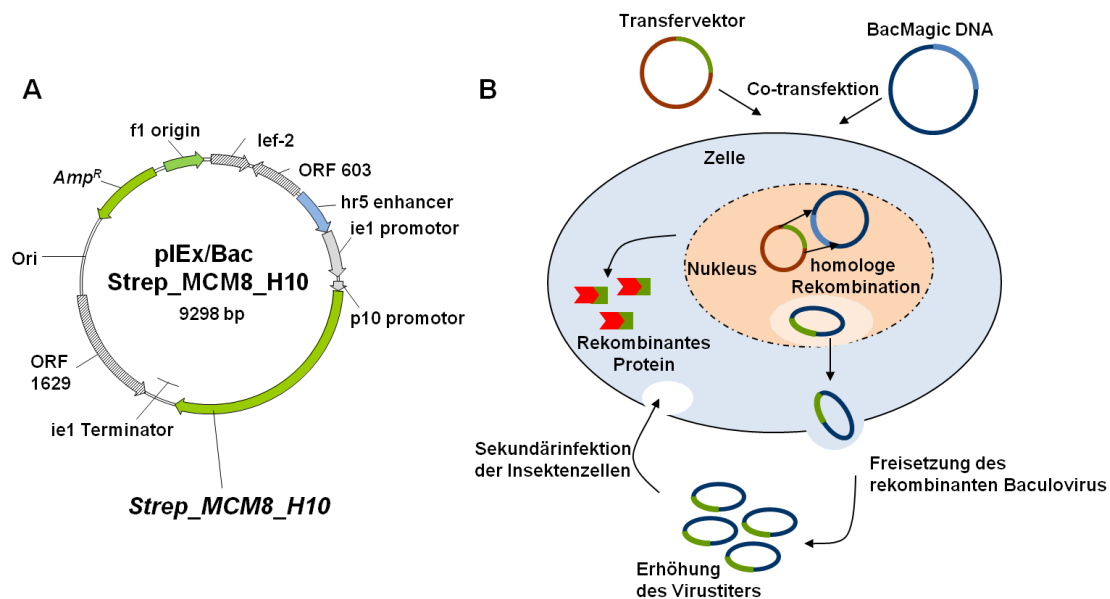


Abb. 3.19 Herstellung eines rekombinanten Baculovirus zur Expression von Strep_MCM8_H10 in Insektenzellen

A: Transfervektor pIEx/Bac_Strep_MCM8_H10 zur Herstellung des rekombinanten Baculovirus (Strep_MCM8_H10). Die genetischen Elemente ORF 1629 und lef-2/ORF603 werden zur homologen Rekombination mit der BacMagic-Baculovirus-DNA benötigt. Im Baculovirus-System steht das Zielgen unter der Kontrolle des p10-Promotors. Für eine optionale transiente Expression nach Transfektion von Insektenzellen mit dem Transfervektor steht das Zielgen im unter der Kontrolle des ie1 (*immediate early*)-Promotors.

B: Schematische Darstellung der Herstellung eines rekombinanten Baculovirus mit dem BacMagic-System von Novagen (Grafik erstellt nach *BacMagic DNA Kit User Protocol* von Novagen)

Außerdem steht im neu entstandenen Baculovirus das Zielgen unter der Kontrolle des baculoviralen Polyhedrin-Promotors. Polyhedrin ist das Hüllprotein des Wildtyp-Baculovirus und wird in großer Menge in der späten Phase einer natürlichen Baculovirus-Infektion gebildet. Für die Infektiosität des Virus ist Polyhedrin jedoch nicht essentiell, daher kann anstelle des Polyhedrins ein rekombinantes

Zielprotein in das Baculovirusgenom eingeschleust werden (Smith *et al.*, 1983a). In einer durch einen Baculovirus vermittelten Expression kann die Ausbeute an rekombinantem Protein günstigen Fällen bis zu 25 % des Gesamtzellproteins ausmachen. Dies entspricht ungefähr dem Anteil des in einer Larve gebildeten Polyhedrins (Pennock *et al.*, 1984) und ist Ausdruck der Stärke des Polyhedrin-Promotors.

Nach der Generierung eines infektiösen Virusstocks wurde die Expression in *High Five* (*HiV*)-Insektenzellen durchgeführt, da sie im Vergleich zur Sf9-Zelllinie für viele Proteine ein höheres Expressionsniveau bieten (Davis *et al.*, 1992; Krammer *et al.*, 2010; Morais *et al.*, 2001).

3.3.2.2. Infektionstests

Um die für eine erfolgreiche Co-Transfektion einzusetzenden Mengen an DNA und an Transfektionsreagenz zu ermitteln, wurde eine Co-Transfektion von BacMagic-DNA und einem für die β -Glucuronidase kodierenden Transferplasmid (Novagen) durchgeführt. Im Fall einer positiven Rekombination von BacMagic-DNA und Transfervektor entließen die Zellen dieses Kontrollansatzes nach 3-5 Tagen die mit Hilfe des neu entstandenen Baculovirus gebildete β -Glucuronidase ins Medium. Durch X-Gluc-Färbung konnte das im Überstand enthaltene Protein nachgewiesen werden (Daten nicht gezeigt).

Zur Generierung des Baculovirus (Strep_MCM8_H10) wurde eine Co-Transfektion von Sf9-Zellen mit dem Transfervektor pLex/Bac_Strep_MCM8_H10 und der BacMagic-DNA (Novagen) durchgeführt. Die Co-Transfektion der Sf9-Zellen erfolgte mit Hilfe des Transfektionsreagenzes Insect GeneJuice (Novagen).

Der Virustiter der initialen Baculovirenstocks wurde in Sf9-Zellen durch 3-4 Amplifikationszyklen erhöht, bis eine erfolgreichen Expression des rekombinanten Proteins durch SDS-PAGE und Western-Blot-Analyse nachgewiesen werden konnte. Anschließend wurde der Virusstock zur Infektion von *HiV*-Zellen eingesetzt. Für den Expressionszeitraum wurde analog der transienten Expression 42 h beibehalten.

Einen Tag nach der Infektion der Insektenzellen mit dem Baculovirus konnte der Erfolg der Infektion sowohl für Sf9- als auch für *HiV*-Zellen mikroskopisch überprüft werden. Uninfizierte Zellen bildeten einen konfluenten Monolayer (Abb 3.20 A+B: G), während die Virus-Infizierten Zellen dazu nicht mehr in der Lage waren, körnig erschienen und aufgrund der Akkumulation viraler Proteine vergrößerte Nuklei aufwiesen (Abb 3.20 A+B: I) (O'Reilly, 1992). Insbesondere *HiV*-Zellen zeigten nach der Infektion mit dem Baculovirus nicht mehr die sonst typische Spindelform, sondern rundeten sich ab und waren somit leicht als infizierte Zellen zu identifizieren.

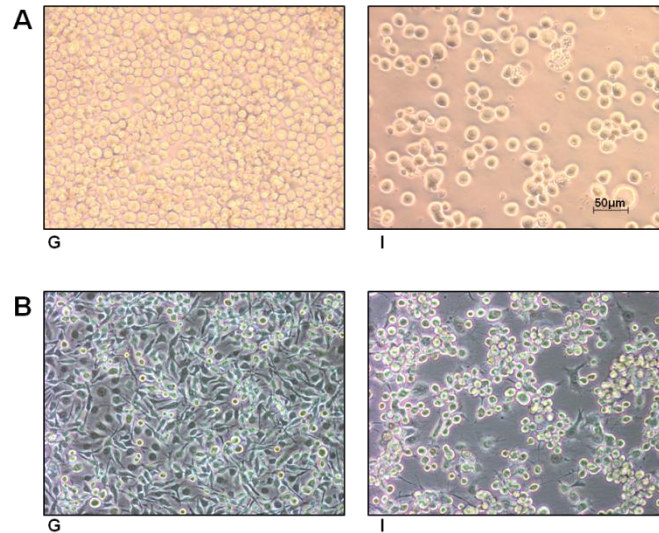


Abb. 3.20 Sf9 (A) bzw. HiV-Insektenzellen (B) nach Infektion mit Baculovirus (Strep_MCM8_H10).
G – gesunde Zellen; I – Zellen infiziert mit Baculovirus

3.3.2.3. Untersuchung von Strep_MCM8_H10 aus HiV-Insektenzellen

HiV-Zellen wurden mit dem Baculovirus (Strep_MCM8_H10) infiziert und für 42 h bei 27°C inkubiert. Das Protein aus dem Zellextrakt wurde mittels Strep-Tactin- bzw. Talon-Chromatographie aufgereinigt und mittels SDS-PAGE und Western-Blot analysiert (Abb. 3.21 A+B).

Nach der Aufreinigung von Strep_MCM8_H10 konnte in den Elutionsfraktionen das Volllängen-Protein ohne eine Kontamination durch Abbruchfragmente nachgewiesen werden (Abb. 3.21 B). Auch wurde bei beiden Aufreinigungen nur geringe Kontamination durch andere Proteine detektiert (Abb. 3.21 A).

Des Weiteren war hier zu beobachten, dass das Protein mit beiden Tags nur schwach an das jeweilige Chromatographiematerial band und viel des rekombinanten Proteins im Säulendurchfluss verblieb. Die Bindung des C-terminalen His-Tags an Talon war hierbei effektiver als die Bindung des N-terminalen Strep-Tags an Strep-Tactin. Dies kann ein Hinweis darauf sein, dass beide Enden des Proteins in der nativen Struktur im Inneren des Proteins verborgen sind und somit für eine Aufreinigung nur schwer zugänglich sind. Bei der Talon-Aufreinigung fiel auf, dass im Coomassie-gefärbten PAA-Gel auf Höhe von Strep_MCM8_H10 eine Doppelbande detektiert wurde (Abb. 3.21 A rechte Seite). Im Western-Blot dagegen wurde nur eine Bande nachgewiesen, was darauf schließen lässt, dass es sich bei der zweiten Bande um ein Proteolysefragment des rekombinanten Proteins handelt, welches den N-Terminus mit dem Strep-Tag verloren hat. Des Weiteren wurde hier noch eine geringe Kontamination durch anderes Protein detektiert. In einem zweiten Aufreinigungsschritt wurde daher das mittels Talon gereinigte Protein mit Heparin-Chromatographie weiter aufgereinigt. In einer Analyse der Strep_MCM8_H10-enthaltenden Elutionsfraktionen im PAA-Gel mit Coomassie-Färbung wurde eine Verminderung der Kontamination durch anderes Protein detektiert (Abb. 3.21 C).

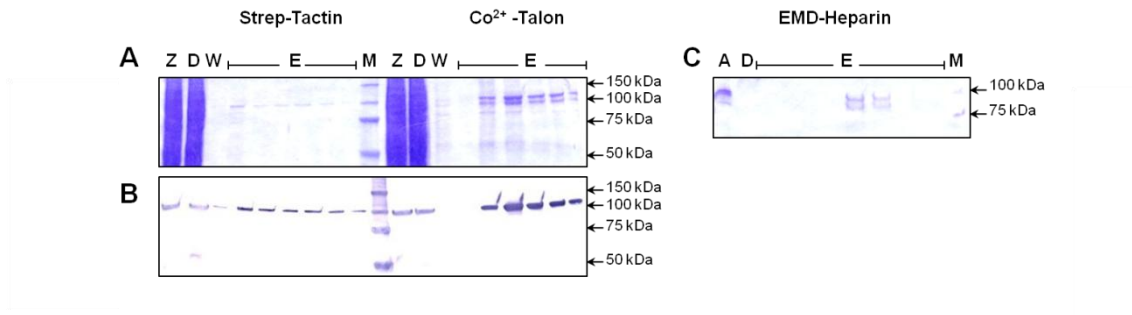


Abb. 3.21 Aufreinigung von Strep_MCM8_H10 aus HiV Insektenzellen

A+B: Das Protein wurde durch SDS-PAGE auf einem 9%igen PAA-Gel mit anschließender Coomassie-Färbung (A) bzw. Western-Blot (B) analysiert. Der immunchemische Nachweis von Strep_MCM8_H10 erfolgte mittels AP-gekoppeltem Strep-Tactin.

C: Die Elutionsfraktionen der Talon-Aufreinigung wurde mittels Heparin-Chromatographie aufgereinigt und durch SDS-PAGE auf einem 9%igen PAA-Gel mit anschließender Coomassie-Färbung analysiert.

A – Säulenauftrag (Elutionsfraktionen der Talon-Chromatographie); Z – Zellextrakt; D – Säulendurchbruch; W – Waschfraktion; M – Molekulargewichtsstandard; E - Elutionsfraktionen

Bei einer Überprüfung der ATPase-Aktivität des mittels Strep-Tactin, Talon bzw. Heparin gereinigten Proteins wurde keine reproduzierbare Aktivität für Strep_MCM8_H10 detektiert (Daten nicht gezeigt). Wie die ATPase-Reaktionen gezeigt haben, besitzt MCM8 alleine vermutlich keine ATPase-Aktivität. Sowohl der Strep- also auch der His-Tag sind sehr klein, was einen Einfluss auf die Aktivität des Proteins unwahrscheinlich macht. Es ist jedoch möglich, dass MCM8 zur Entfaltung einer DNA-abhängigen ATPase-Aktivität einen oder mehrere Interaktionspartner benötigt.

3.3.3. Co-Expression von MCM8 und CDC45 in *HiV*-Zellen

Da für MCM8 alleine keine DNA-abhängige ATPase-Aktivität detektiert werden konnte, benötigt es zur Ausübung seiner biologischen Funktion möglicherweise einen oder mehrere Cofaktoren. Für den MCM2-7 Komplex wurde gezeigt, dass eine Interaktion mit CDC45 erforderlich ist, um seine Helikaseaktivität zu entwickeln (Aparicio *et al.*, 2006; Moyer *et al.*, 2006; Pacek & Walter, 2004). Des Weiteren wird CDC6 benötigt, um MCM2-7 ans Chromatin zu rekrutieren (Pospiech *et al.*, 2010).

CDC45 ist ein essentielles Protein für die Initiation (Aparicio *et al.*, 1997; Hardy, 1997; Owens *et al.*, 1997; Uchiyama *et al.*, 2001) sowie der Elongation der DNA-Replikation (Bauerschmidt *et al.*, 2007; Pacek & Walter, 2004; Tercero *et al.*, 2000). Es interagiert mit der DNA-Polymerase und bildet mit MCM2-7 und GINS den CMG-Komplex und damit die aktive Helikase der eukaryotischen DNA-Replikation (Aparicio *et al.*, 2009; Bauerschmidt *et al.*, 2007; Costa *et al.*, 2011; Ilves *et al.*, 2010; Moyer *et al.*, 2006).

Für MCM8 wurde bereits gezeigt, dass das Protein mit MCM4, 6 und 7 co-immunopräzipitiert (Johnson *et al.*, 2003) und mit CDC6 interagiert (Volkening & Hoffmann, 2005). Im Folgenden sollte daher eine mögliche Interaktion von MCM8 mit CDC45 untersucht werden.

3.3.3.1. Co-Aufreinigung von Strep_MCM8 und His_CDC45

Zur Überprüfung einer möglichen Interaktion von Strep_MCM8 und His_CDC45 wurden beide rekombinanten Proteine gemeinsam in Insektenzellen exprimiert und mittels der entsprechenden Chromatographiematerialien aufgereinigt. Sollte eine Interaktion stattfinden, kann der jeweilige Interaktionspartner mit dem an die Säule bindenden Protein co-eluiert werden.

Der Baculovirus (Strep_MCM8) wurde durch Rekombination der BacMagic-DNA (Novagen) und dem Transfervektor pLEX/Bac_Strep_MCM8 in *Sf9*-Zellen hergestellt. Der Baculovirus (His_CDC45) wurde freundlicherweise von Helmut Pospiech aus Jena zur Verfügung gestellt.

HiV-Insektenzellen wurden separat sowie gleichzeitig mit den Baculoviren (Strep_MCM8) und (His_CDC45) infiziert und für 42 h bei 27°C inkubiert. Die Expression beider Proteine wurde durch SDS-PAGE und Western-Blot-Analyse bestätigt (Abb. 3.22).



Abb. 3.22 Co-Expression von Strep_MCM8 und His_CDC45 in *HiV* Insektenzellen

Das Protein wurde durch SDS-PAGE auf einem 8,5%igen PAA-Gel mit anschließendem Western-Blot analysiert. Die immunchemischen Nachweise erfolgten mit folgenden Antikörpern (AK): Strep_MCM8 mittels α -MCM8 C-term AK aus dem Kaninchen und HRP-gekoppeltem AK gegen Kaninchen; His_CDC45 mittels α -CDC45 3G-10 AK aus der Ratte und HRP-gekoppeltem AK gegen Ratte. G – Gesamtzellextrakt; Z – Zellextrakt

Um eine mögliche unspezifische Bindung der Proteine an das jeweilige Chromatographiematerial auszuschließen, wurden die rekombinanten Proteine zunächst separat in *HiV*-Zellen exprimiert und anschließend jeweils mittels Talon und Strep-Tactin gereinigt. Die Elutionsfraktionen wurden mittels SDS-PAGE und Western-Blot analysiert (Abb. 3.23). Strep_MCM8 sollte aufgrund des fehlenden His-Tags nicht in der Lage sein, an Talon zu binden, während von His_CDC45 aufgrund des fehlenden Strep-Tags keine Bindung an Strep-Tactin erwartet wurde.

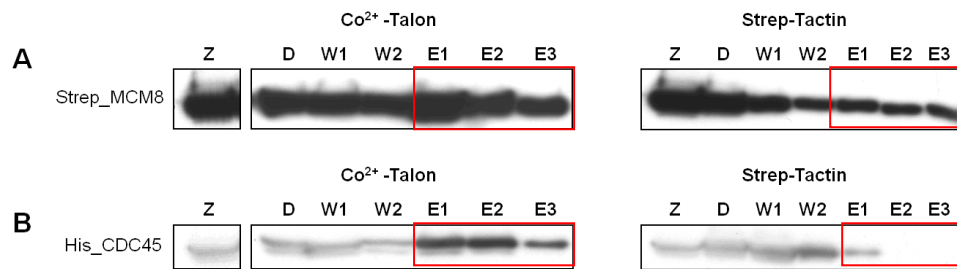


Abb. 3.23 Aufreinigung von Strep_MCM8 bzw. His_CDC45 aus *HiV* Insektenzellen

Das Protein wurde durch SDS-PAGE auf einem 8,5%igen PAA-Gel mit anschließendem Western-Blot analysiert. Die immunchemischen Nachweise erfolgten mit folgenden Antikörpern (AK): Strep_MCM8 mittels α -MCM8 C-term AK aus dem Kaninchen und HRP-gekoppeltem AK gegen Kaninchen; His_CDC45 mittels α -CDC45 3G-10 AK aus der Ratte und HRP-gekoppeltem AK gegen Ratte.

A: Aufreinigung von Strep_MCM8 mittels Talon- bzw. Strep-Tactin-Chromatographie

B: Aufreinigung von His_CDC45 mittels Talon- bzw. Strep-Tactin-Chromatographie

Rot markiert sind die jeweiligen Elutionsfraktionen.

Z – Zellextrakt; D – Säulendurchbruch; W1/2 – Waschfraktionen; A – Säulenauftrag; E1-3 – Elutionsfraktionen

Für His-CDC45 ergab sich wie erwartet eine Bindung an das Talon-Säulenmaterial (Abb. 3.23). Allerdings wurde auch eine gewisse Menge Strep_MCM8 mittels Talon-Chromatographie aufgereinigt (Abb. 3.23), was darauf schließen lässt, dass es sich hierbei um eine unspezifische Wechselwirkung mit der Chromatographiematrix oder eine unspezifische Interaktion mit anderen, unspezifisch an die Säule bindenden Proteinen handelt. Wie erwartet zeigte sich für His_CDC45 keine Bindung an Strep-Tactin (Abb. 3.23 B). Für Strep_MCM8 ließ sich wie erwartet eine Bindung an das Säulenmaterial nachweisen (Abb. 3.23 A).

HiV-Insektenzellen wurden gleichzeitig mit den Baculoviren (Strep_MCM8) und (His_CDC45) infiziert und für 42 h bei 27°C inkubiert. Eine sukzessive Aufreinigung des Zelllextrakt-Proteins mittels Talon- und anschließender Strep-Tactin-Chromatographie sollte zeigen, ob beide Proteine mittels beider Säulenmaterialien co-aufgereinigt werden können. Die Elutionsfraktionen wurden mittels SDS-PAGE und Western-Blot analysiert (Abb. 3.24). Im Falle einer möglichen Interaktion von Strep_MCM8 und His-CDC45 wurde erwartet, dass nach der Aufreinigung des Zelllextraktes über beide Säulenmaterialien beide Proteine in den Elutionsfraktionen nachgewiesen werden können.

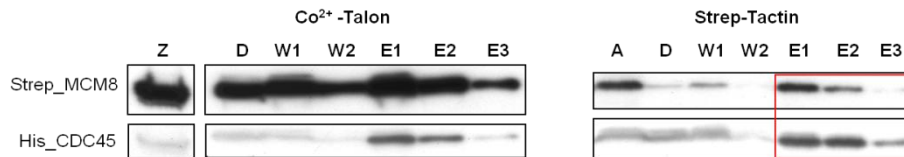


Abb. 3.24 Co-Aufreinigung von Strep_MCM8 und His_CDC45 nach gleichzeitiger Expression aus *Hiv* Insektenzellen

Das Protein wurde durch SDS-PAGE auf einem 8,5%igen PAA-Gel mit anschließendem Western-Blot analysiert. Die immunchemischen Nachweise erfolgten mit folgenden Antikörpern (AK): Strep_MCM8 mittels α -MCM8 C-term AK aus dem Kaninchen und HRP-gekoppeltem AK gegen Kaninchen; His_CDC45 mittels α -CDC45 3G-10 AK aus der Ratte und HRP-gekoppeltem AK gegen Ratte. Rot markiert sind diejenigen Fraktionen, in denen His-CDC45 mit Strep_MCM8 co-eluiert. Z – Zell-extrakt; D – Säulendurchbruch; W1/2 – Waschfraktionen; A – Säulenauftrag; E1-3 – Elutionsfraktionen

In der Co-Aufreinigung binden im ersten Aufreinigungsschritt erwartungsgemäß beide Proteine an das Talon-Säulenmaterial und eluieren gemeinsam (Abb. 3.24 Co²⁺-Talon). Im zweiten Aufreinigungsschritt bindet Strep_MCM8 an Strep-Tactin. Auch hier eluieren His_CDC45 und Strep_MCM8 zusammen (Abb. 3.24 Strep-Tactin). Da His_CDC45 alleine nicht an Strep-Tactin bindet (Abb. 3.23 B), deutet dieses Ergebnis darauf hin, dass His_CDC45 mit Strep_MCM8 interagiert und so nach der Elution mit Desthiobiotin mit Strep_MCM8 co-eluiert.

Um auszuschließen, dass es sich bei der beobachteten Co-Elution um eine unspezifische Interaktion der Tags handelte, wurden die Interaktion von MCM8 und CDC45 im Folgenden mit der C-terminal His-getaggten MCM8-Variante MCM8_H10 und der ungetaggten Variante von CDC45 weitergehend untersucht.

Die Interaktion von MCM8_H10 und CDC45 wurde im Folgenden mittels analytischer Gelfiltration sowie Immunopräzipitations-Experimenten untersucht.

3.3.3.2. Analytische Gelfiltration von MCM8_H10 und CDC45

Das Medium der Gelfiltrationschromatographie ist eine poröse Matrix aus sphärischen Partikeln, die Poren verschiedene Größe aufweisen. Anders als in der Affinitäts- oder Ionenaustauschchromatographie binden die Proteine nicht an das Säulenmaterial, sondern passieren abhängig von ihrer Größe unterschiedlich schnell die Poren der Chromatographiematrix und werden so ihrer Größe entsprechend aufgetrennt. Die mobile Phase hat hier keinen unmittelbaren Einfluss auf die Trennung, sondern dient nur als Lösungsmittel. Moleküle, die aufgrund ihrer Größe nicht in die Poren der Matrix eindringen, passieren die Säule mit der gleichen Geschwindigkeit wie das Lösungsmittel und eluieren zusammen mit der Lösungsmittelfront im Ausschlussvolumen. Proteine mittlerer Größe können teilweise in die Matrix eindringen, werden entsprechend ihrer Größe in ihrem Lauf verzögert und eluieren zu unterschiedlichen Zeitpunkten. Sehr kleine Proteine dringen vollständig in die Matrix ein und eluieren als letztes. Daher muss ein Trennmaterial gewählt werden, welches eine hohe Auflösung im Bereich der Größe des erwarteten Proteins oder Proteinkomplexes aufweist.

Das Gelfiltrationsmaterial Superose12 eignet sich zur Trennung von Proteinen und Proteinkomplexen von 1-300 kDa und ist somit geeignet z. B. ein Heterodimer von MCM8 und CDC45 (ca. 170 kDa), mögliche Homodimere von MCM8 (ca. 190 kDa) oder andere Multimere beider Proteine zu identifizieren.

Die Baculoviren (MCM8_H10) und (CDC45) wurden durch Rekombination der BacMagic-DNA (Novagen) und den Transfervektoren pIEX/Bac_MCM8_H10 bzw. pIEX/Bac_CDC45 in *Sf9*-Zellen hergestellt. *HiV*-Insektenzellen wurden gleichzeitig mit den Baculoviren (MCM8_H10) und (CDC45) infiziert und für 42 h bei 27°C inkubiert. Die Expression beider Proteine wurde durch SDS-PAGE und Western-Blot-Analyse bestätigt (Daten nicht gezeigt).

Der Zellextrakt wurde zunächst mittels DEAE-Minichromatographie vorgereinigt, um für die Gelfiltration einen Teil des Zellextraktproteins sowie die an DEAE sehr stark bindende DNA von MCM8_H10 und CDC45 abzutrennen. Die Fraktionen der DEAE-Chromatographie wurden mittels SDS-PAGE und Western-Blot analysiert (Abb. 3.25). Es konnte gezeigt werden, dass MCM8_H10 durch Elution mit 100-700 mM NaCl gleichmäßig über den gesamten Gradienten vom DEAE-Säulenmaterial eluiert. CDC45 co-eluiert am stärksten im Bereich von 300-500 mM NaCl mit MCM8_H10 (Abb. 3.25 rot markiert).

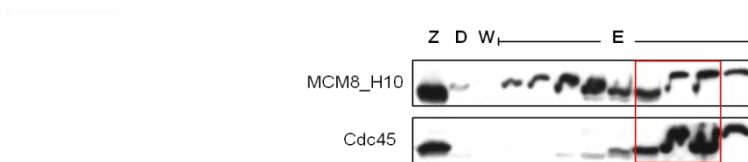


Abb. 3.25 Vorreinigung von MCM8_H10 und CDC45 nach gleichzeitiger Expression aus *HiV* Insektenzellen

Die Proteine wurden mittels DEAE-Chromatographie aufgereinigt und durch SDS-PAGE auf einem 8,5%igen PAA-Gel mit anschließendem Western-Blot analysiert. Die immunchemischen Nachweise erfolgten mit folgenden Antikörpern (AK): Strep_MCM8 mittels α -MCM8 C-term AK aus dem Kaninchen und HRP-gekoppeltem AK gegen Kaninchen; His_CDC45 mittels α -CDC45 H-300 AK aus dem Kaninchen und HRP-gekoppeltem AK gegen Kaninchen. Rot markiert sind diejenigen Fraktionen, welche für die Gelfiltration eingesetzt wurden.

Fraktionen, in denen MCM8_H10 und CDC45 co-eluierten, wurden vereinigt und über Nacht gegen den Gelfiltrationspuffer dialysiert. Das dialysierte Protein wurde über eine Superose12-Gelfiltrationssäule aufgetrennt und das Elutionsprofil aufgezeichnet (Abb. 3.26 A blaue Linie). Um Aufschluss über die molekulare Masse der eluierten Protein oder Proteinkomplexe zu erhalten, wurde die Säule vorher mit Proteinen bekannter molekularer Masse kalibriert (Abb. 3.26 A rote Linie).

Das Elutionsprofil der MCM8_H10/CDC45-Gelfiltration zeigte zwei deutliche Peaks. Ein größerer breiter Peak wurde bei ca. 70-100 kDa identifiziert (Abb. 3.26 A blaue Linie) und liegt damit im Bereich der erwarteten molekularen Massen von MCM8_H10 (ca. 96 kDa) bzw. CDC (ca. 75 kDa). Weder für MCM8_H10 noch für CDC45 konnte hier eine abgrenzbare Molekulargewichtspezies detektiert werden. Ein kleinerer Peak wurde bei ca. 230 kDa identifiziert (Abb. 3.26 A blaue Linie). Dies entspricht in etwa der Masse eines Heterotrimers aus zwei Molekülen CDC45 und einem Molekül MCM8_H10 (ca. 240 kDa).

Um einen genaueren Aufschluss über den Gehalt von MCM8_H10 und CDC45 in den Elutionsfraktionen zu erhalten, wurden die Elutionsfraktionen der MCM8_H10/CDC45-Gelfiltration (Abb. 3.26 A gelb markiert) anschließend mittels SDS-PAGE und Western-Blot analysiert

(Abb. 3.26 B). Hier war zu beobachten, dass CDC45 sich über das gesamte Elutionsprofil erstreckt, was auf Aggregate des Proteins in unterschiedlicher Größe oder eine unspezifische Interaktion des Proteins mit dem Säulenmaterial schließen lässt. MCM8_H10 hingegen eluiert früh (Abb. 3.26 Fraktionen 10+12), dies entspricht den Fraktionen des Markerproteins Catalase auf Höhe von ca. 240 kDa. In diesen Fraktionen wurde ebenfalls ein großer Anteil von CDC45 detektiert. Dies könnte ebenfalls auf eine Interaktion von MCM8_H10 und CDC45 hinweisen.

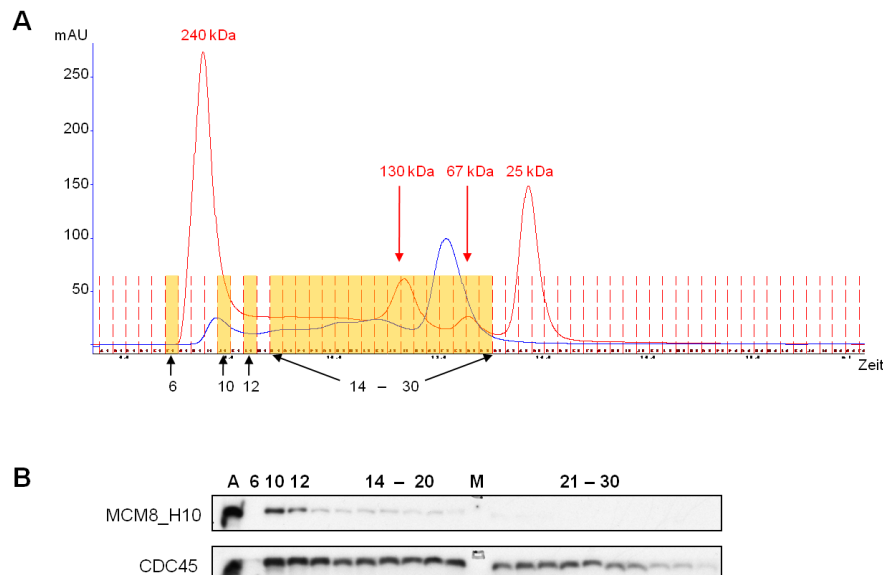


Abb. 3.26 Analyse von Strep_MCM8 und His_CDC45 aus HiV Insektzellen mittels Gelfiltration

MCM8_H10 und CDC45 wurden zunächst aus HiV-Zellextrakt mittels DEAE-Chromatographie aufgereinigt. Fraktionen, in denen beide Proteine co-eluierten wurden vereinigt, über Nacht dialysiert und mittels Superose12 - Gelfiltration aufgetrennt.

A: Rote Linie: Elutionsprofil des Molekulargewichtsstandards, die Peaks entsprechen den vier Proteinen des Standards; Blaue Linie: Elutionsprofil der zu analysierenden Proteinlösung. Die gelb markierten Fraktionen wurden per SDS-PAGE analysiert.

B: Western-Blot-Analyse der gekennzeichneten Fraktionen auf einem 8,5%igen PAA-Gel. Die immunochemischen Nachweise erfolgten mit folgenden Antikörpern (AK): MCM8_H10 mittels α -MCM8 C-term Antikörper aus dem Kaninchen und HRP-gekoppeltem Antikörper gegen Kaninchen; CDC45 mittels α -CDC45 H-300 Antikörper aus dem Kaninchen und HRP-gekoppeltem Antikörper gegen Kaninchen. A – Säulenauftrag; M – Molekulargewichtsstandard

Um die Interaktion von MCM8_H10 mit CDC45 weitergehend zu untersuchen, wurden Immunopräzipitationsexperimente mit Zellextrakten durchgeführt, in denen MCM8_H10 und CDC45 co-exprimiert wurden.

3.3.3.3. Co-Immunopräzipitation von MCM8_H10 und CDC45

Die Immunopräzipitation (IP) basiert auf der spezifischen Interaktion eines Antikörpers mit seinem Zielprotein. Ein spezifischer Antikörper wird zu einem Zellextrakt gegeben, wo dieser das Zielprotein bindet. Anschließend wird Antikörper-bindendes Protein A bzw. G, welches an ein Trägermaterial gekoppelt ist, zum Zellextrakt gegeben, wodurch Protein A bzw. G an den Antikörper/Zielprotein – Komplex bindet. Durch Präzipitation des Trägermaterials wird auch das über Protein A bzw. G gebundene Protein präzipitiert. Im Falle einer Interaktion des Zielproteins mit einem anderen Protein des Zellextraktes co-präzipitiert dieses mit dem Zielprotein und kann so als Interaktionspartner identifiziert werden.

Zur Untersuchung der Interaktion von MCM8_H10 und CDC45 wurden zunächst *HiV*-Zellen mit Baculovirus (MCM8_H10) und (CDC45) co-infiziert, für 42 h bei 27°C inkubiert und anschließend der Zellextrakt präpariert. Zur Bindung der rekombinanten Proteine wurden die MCM8-Antikörper α -MCM8 (C-term) bzw. (full) und die CDC45-Antikörper Antikörper α -CDC45 H-300 bzw. P-3 in getrennten Ansätzen zum *HiV*-Zellextrakt gegeben. Als Negativkontrolle wurde ein Ansatz mit K32pre Serum aus dem Kaninchen mitgeführt. Durch die Antikörper des Serums wurden unspezifisch an Antikörper bindende Proteine gebunden. Hierdurch sollte ausgeschlossen werden, dass eine unspezifische Bindung von MCM8_H10 oder CDC45 an die Antikörper stattfindet. Die Präzipitation der Antikörper/Protein-Komplexe erfolgte durch Protein G-gekoppelte Gamma-Bind-Plus Sepharose (GE Healthcare). Die Sepharose wurde durch Zentrifugation sedimentiert und die Immunopräzipitate sowie die Überstände mittels SDS-PAGE und Western-Blot analysiert (Abb. 3.27).

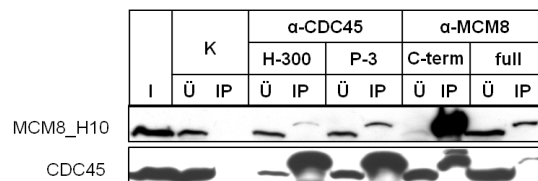


Abb. 3.27 Co-Immunopräzipitation von MCM8_H10 und His_CDC45 aus *HiV* Insektenzellen

Die Proben wurden durch SDS-PAGE auf einem 8,5%igen PAA-Gel mit anschließendem Western-Blot analysiert. Die immunchemischen Nachweise erfolgten mit folgenden Antikörpern (AK): MCM8_H10 mittels α -MCM8 K15 AK aus der Ziege und HRP-gekoppeltem AK gegen Ziege; CDC45 mittels α -CDC45 3G-10 AK aus der Ratte und HRP-gekoppeltem AK gegen Ratte. I – Input (Zellextrakt); K – Negativkontrolle (IP mit K32pre Serum aus Kaninchen); Ü – Überstand; IP - Immunopräzipitation

Bei einem Vergleich der Immunopräzipitationen mit den Überständen ist deutlich zu erkennen, dass durch die CDC45-Antikörper das im Zellextrakt enthaltene CDC45 fast vollständig präzipitiert wurde (Abb. 3.27). Für MCM8 konnte ebenfalls eine vollständige Präzipitation durch den Antikörper anti-MCM8 (C-Term) erreicht werden (Abb. 3.27). Die Immunopräzipitation mit dem Antikörper anti-MCM8 (full) war ebenfalls erfolgreich, wenn auch MCM8 hier nicht vollständig präzipitiert wurde.

Außerdem konnte für MCM8_H10 sowie für CDC45 nachgewiesen werden, dass durch Präzipitation mit allen eingesetzten Antikörpern jeweils CDC45 bzw. MCM8_H10 co-präzipitiert. Dieses Ergebnis spricht ebenfalls für eine Interaktion beider Proteine. Eine unspezifische Bindung der Proteine an die

Antikörper kann ausgeschlossen werden, da im Präzipitat der Negativkontrolle weder MCM8_H10 noch CDC45 nachgewiesen wurden.

Die Ergebnisse aus Co-Aufreinigung, Gelfiltration und Immunopräzipitation von MCM8 und CDC45 aus Insektenzellen sprechen dafür, dass es sich bei den beiden Proteinen um Interaktionspartner handelt. Weiteren Aufschluss über eine Interaktion von MCM8 und CDC45 sollte die Untersuchung der Proteine *in vivo* in humanen HeLa-Zellen liefern.

3.4. Interaktion von MCM8 und CDC45 in HeLa-Zellen

Um die Interaktion zweier humaner Proteine zu untersuchen, ist es sinnvoll, nach einer Korrelation des Auftretens beider Proteine während der Ausübung ihrer natürlichen Funktion zu suchen. Eine Untersuchung humaner Proteine in ihrem natürlichen System der menschlichen Zelle kann am besten in HeLa-Zellen, einer immortalisierten Karzinomzelllinie durchgeführt werden. HeLa-Zellen können im Monolayer kultiviert werden und sind ein gut etabliertes System, um humane Proteine *in vivo* zu untersuchen.

MCM8 zeigt große Ähnlichkeit zu den Proteinen MCM2-7, was auf eine ähnliche Funktion von MCM8 während des Zellzyklus schließen lässt (Gozaucik *et al.*, 2003; Johnson *et al.*, 2003; Maiorano *et al.*, 2005). Die Beteiligung von CDC45 an der Aktivierung des MCM2-7-Komplexes wurde in Hefen, *Drosophila* und *Xenopus* ebenfalls bereits nachgewiesen (Ilves *et al.*, 2010; Pacek & Walter, 2004; Zou *et al.*, 1997). Es liegt daher nahe, ein möglicherweise korreliertes Auftreten von MCM8 und CDC45 während des humanen Zellzyklus zu untersuchen. Sollten die beiden Proteine funktionell interagieren, ist ein gemeinsames Auftreten in den gleichen Phasen des Zellzyklus zu erwarten. Um nachzuweisen, dass auch in diesem System eine Interaktion beider Proteine stattfindet, wurden zunächst Immunopräzipitationsexperimente mit HeLa-Zellextrakten durchgeführt.

3.4.1. Co-Immunopräzipitation von MCM8 und CDC45 aus HeLa-Zellen

Mit dem Zellextrakt logarithmisch wachsender HeLa-Zellen wurde eine Co-Immunopräzipitation von MCM8 und CDC45 durchgeführt. Zur Bindung der rekombinanten Proteine wurden die MCM8-Antikörper α -MCM8 K15, (C-term) bzw. (full) und die CDC45-Antikörper α -CDC45 H-300 bzw. P-3 in getrennten Ansätzen zum HeLa-Zellextrakt gegeben. Die Präzipitation der Antikörper/Protein-Komplexe erfolgte durch Magnetische Kügelchen (*Magnetic Beads* von Milteny Biotech.) Die Magnetischen Kügelchen wurden mit Hilfe des μ MACS-Separators an eine magnetische Matrix fixiert. Die Überstände wurden aufgefangen und die gebundenen Proteine mit 95°C heißem Proteinauftragepuffer eluiert. Die so erhaltenen Immunopräzipitate sowie die Überstände wurden mittels SDS-PAGE und Western-Blot analysiert (Abb. 3.28).

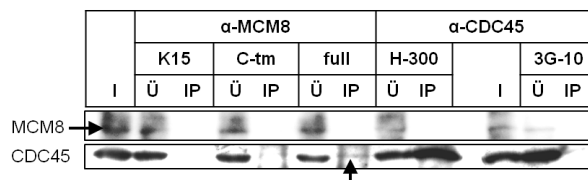


Abb. 3.28 Co-Immunopräzipitation von MCM8 und CDC45 aus HeLa-Zellen

Die Proben wurden durch SDS-PAGE auf einem 8,5%igen PAA-Gel mit anschließendem Western-Blot analysiert. Die immunchemischen Nachweise erfolgten mit folgenden Antikörpern (AK): MCM8 mittels α -MCM8 K15 AK aus der Ziege und HRP-gekoppeltem AK gegen Ziege; CDC45 mittels α -CDC45 3G-10 AK aus der Ratte und HRP-gekoppeltem AK gegen Ratte. Der Pfeil kennzeichnet in einer MCM8-IP präzipitiertes CDC45. I – Input (Zellextrakt); Ü – Überstand; IP - Immunopräzipitation

CDC45 konnte hier nur mit anti-CDC45 H300 präzipitiert werden (Abb. 3.28 ‚H300‘). Eine Präzipitation von MCM8 konnte mit allen hier verwendeten Antikörpern nicht nachgewiesen werden. Eventuell reicht die Affinität der für die Präzipitation verwendeten Antikörper nicht aus, die relativ geringen Mengen von MCM8 aus HeLa-Zelleextrakten zu präzipitieren, so dass sie nach einer Immunopräzipitation im Western-Blot nicht nachgewiesen werden können. Eine weitere Möglichkeit besteht darin, dass die für den Nachweis von MCM8 im Western-Blot verwendeten Antikörper-Kombinationen anti-MCM8(K15)/anti-Ziege-HRP (Abb. 3.28) bzw. anti-MCM8 (N-term)/anti-Kaninchen-HRP (Daten nicht gezeigt) für einen Nachweis von MCM8 nach der verwendeten Präparationsmethode nicht ausreichend sensitiv waren. Jedoch lässt sich eine geringe Menge CDC45 nachweisen, welches in einer Immunopräzipitation mit dem MCM8-Antikörper α -MCM8 (full) präzipitiert wurde (Abb. 3.28 Pfeil). Dies lässt vermuten, dass MCM8 und damit interagierendes CDC45 präzipitiert wurde, die Menge an MCM8 für einen Nachweis in der Western-Blot-Analyse aber nicht ausreicht. Um weitere Hinweise auf eine Interaktion von MCM8 und CDC45 zu erhalten, wurde deren Auftreten in verschiedene Phasen des HeLa-Zellzyklus untersucht.

3.4.2. Auftreten von MCM8 und CDC45 in synchronisierten HeLa-Zellen, FACS-Analyse

Während des Zellzyklus weisen logarithmisch wachsende HeLa-Zellen eine charakteristische Verteilung über die Zellzyklusphasen auf. Nur ca. 10-20 % der Zellen befinden sich in der Synthese (S)-Phase, während der größte Teil in der G1-Phase zu finden ist (Abb. 3.29). Zur Untersuchung der Replikation ist es erforderlich, die Zellen in der G1 bzw. S-Phase anzureichern. Hierfür wurden HeLa-Zellen mittels Mimosin und Thymidin synchronisiert. Durch Mimosin werden die Zellen in der G1-Phase arretiert. Hier können Proteine untersucht werden, die während der Initiation der DNA-Replikation aktiv sind. Durch Thymidin werden die Zellen am G1/S-Phase-Übergang arretiert. Nach entlassen der Zellen aus dem Thymidin-Block gehen diese synchron in die S-Phase über. So können die Zellen zu unterschiedlichen Zeitpunkten während der S-Phase geerntet und im Hinblick auf die für die DNA-Replikation relevanten Proteine untersucht werden. Logarithmisch wachsende Zellen dienen zur Festlegung der Zellzyklusgrenzen (Abb. 3.29).

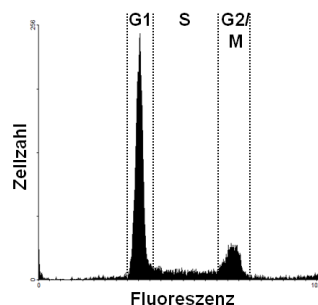


Abb. 3.29 Histogrammdarstellung der durchflusszytometrischen Analyse logarithmisch wachsender HeLa-Zellen

Die Fluoreszenzintensität entspricht dem DNA-Gehalt der Zellen. Asynchron wachsende Zellen dienten als eine Kontrolle für die logarithmische Zellzyklus-Klassifizierung (G1: 66 %; S: 16 %; G2/M: 18 %). Zellen in der G1-Phase enthalten den einfachen, Zellen am G2/M-Phase-Übergang den doppelten Chromosomensatz

In der G1-Phase befindliche Zellen enthalten den einfachen Chromosomensatz. Dieser wird während der Synthesephase verdoppelt, so dass die Zellen am G2/M-Phase-Übergang den doppelten Chromosomensatz aufweisen.

HeLa-Zellen wurden mittels Mimosin und Thymidin synchronisiert und so während der G1-Phase (Mimosin-blockierte Zellen), zu Beginn der S-Phase (Thymidin-blockierte Zellen) sowie 3, 6 und 9 Stunden nach Entlassung aus dem Thymidin-Block geerntet. Zur Bestimmung des DNA-Gehaltes wurde ein Aliquot der Zellen entnommen, die DNA mit Propidiumjodid angefärbt und die Zellen mittels *Fluorescence Activated Cell Sorting* (FACS) analysiert (Abb. 3.30 A). Durch die Synchronisation der Zellen konnte zu jedem Zeitpunkt der Zellernte eine Aussage darüber getroffen werden, welcher Prozentsatz der Zellen sich in den jeweiligen Zellzyklusphasen befand (Abb. 3.30 B).

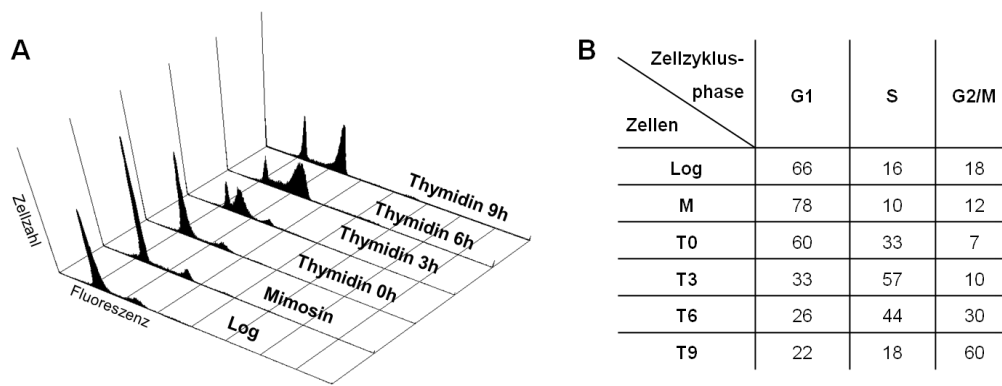


Abb. 3.30 FACS-Analyse synchronisierter HeLa-Zellen

A: Histogrammdarstellung der durchflusszytometrischen Analyse logarithmisch wachsender (log) sowie Mimosin- und Thymidin-synchronisierter HeLa-Zellen. Die Fluoreszenzintensität entspricht dem DNA-Gehalt der Zellen.

B: Tabellarische Darstellung der Zellzahlen in den einzelnen Zellzyklusphasen zu verschiedenen Zeitpunkten im Zellzyklus in Prozent der Gesamtzellzahl

Durch den Mimosin-Arrest wurde eine Anreicherung von 78% der HeLa-Zellen in der späten G1-Phase erreicht (Abb. 3.30 A, Mimosin). 60% der Thymidin-behandelte Zellen wurden am G1/S-Phase-Übergang arretiert (Abb. 3.30 A, Thymidin 0h). 3 Stunden nach der Entlassung aus dem Thymidin-Block befanden sich 57% der Zellen in der S-Phase (Abb. 3.30 A, Thymidin 3h), nach 6 Stunden wurden 44% der Zellen in der S-Phase und 30 % der Zellen am G2/M-Phase-Übergang identifiziert (Abb. 3.30 B, Thymidin 6h). Nach 9 Stunden befanden sich 60% der Zellen am G2/M-Phase-Übergang (Abb. 3.30 A, Thymidin 9h).

Zur Analyse des Auftretens von MCM8 und CDC45 während der einzelnen Zellzyklusphasen wurden aus den oben analysierten synchronisierten HeLa-Zellen die löslichen sowie die chromatin-gebundenen Proteine getrennt präpariert. Anschließend wurden die fraktionierten Zellextrakte mittels SDS-PAGE und Western-Blot im Hinblick auf das Auftreten von MCM8, CDC45 und MCM2 analysiert (Abb. 3.31). Für das lösliche Protein wurde MEK-2, bei den chromatingebundenen Proteinen PCNA als Ladekontrolle nachgewiesen.

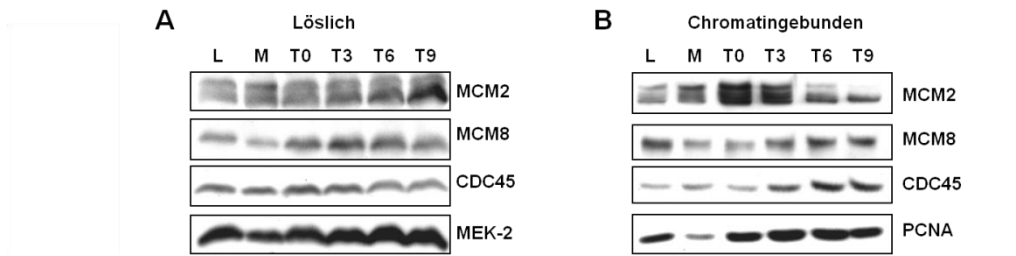


Abb. 3.31 Analyse der Zellextrakt-Fractionen synchronisierter HeLa-Zellen

Western-Blot-Analyse der löslichen (A) sowie der chromatingebundenen Zellextrakt-Fraktion (B) synchronisierter HeLa-Zellen auf einem 8,5%igen PAA-Gel. Die immunchemischen Nachweise erfolgten mit folgenden Antikörpern (AK): MCM8 mittels α -MCM8 C-term AK aus dem Kaninchen und HRP-gekoppeltem AK gegen Kaninchen; CDC45 mittels α -CDC45 H-300 AK aus dem Kaninchen und HRP-gekoppeltem AK gegen Kaninchen; MEK-2 mittels α -MEK2 aus der Maus und HRP-gekoppeltem AK gegen Maus; PCNA mittels α -PCNA PC10 aus der Maus und HRP-gekoppeltem AK gegen Maus; MCM2 mittels α -MCM2 N19 aus der Ziege und HRP-gekoppeltem AK gegen Ziege. L – logarithmisch wachsende Zellen; M – Mimosin-arretierte Zellen; T0-9 – Zellen 0-9 Stunden nach Thymidin-Arrest

MCM2 wurde bereits als Bestandteil der Helikase MCM2-7 identifiziert und ist in diesem Zusammenhang an der Initiation der eukaryotischen DNA-Replikation beteiligt (Ishimi *et al.*, 2001; Yan *et al.*, 1993). Es wird demnach erwartet, dass MCM2 zu Beginn der Synthesephase verstärkt chromatingebunden vorliegt. Dies konnte hier bestätigt werden (Abb. 3.31 B). Da CDC45 ebenfalls an der Initiation der DNA-Replikation beteiligt ist (Aparicio *et al.*, 1997; Uchiyama *et al.*, 2001), konnte das Protein ebenfalls zu Beginn der Synthesephase nachgewiesen werden, jedoch lag das Protein hier überwiegend löslich vor (Abb. 3.31 A). Eine verstärkte Chromatinbindung von CDC45 ließ sich hier erst gegen Ende der Synthesephase beobachten (Abb. 3.31 B). Gleiches gilt für MCM8, welches in Korrelation mit CDC45 in der späten S-Phase chromatingebunden vorlag (Abb. 3.31 B). Dieses Ergebnis unterstützt die Vermutung, dass MCM8 als potentielle Helikase erst nach Initiation der DNA-Replikation in Funktion tritt (Gozuacik *et al.*, 2003; Maiorano *et al.*, 2005). Da MCM8 und CDC45 zeitgleich an Chromatin binden, ist möglicherweise außerdem eine funktionelle Interaktion mit CDC45 erforderlich, damit MCM8 seine Aktivität entfalten kann.

4. Zusammenfassende Diskussion und Ausblick

In dieser Arbeit wurde die Expression, Aufreinigung und Aktivität des humanen MCM8-Proteins sowie dessen Interaktion mit dem essentiellen eukaryotischen Replikationsfaktor CDC45 untersucht. MCM8 besitzt große Homologie zu den MCM2-7-Proteinen, welche ein essentieller Bestandteil des Helikase-Komplexes für die DNA-Replikation in Eukaryoten sind (Aparicio *et al.*, 2009; Boskovic *et al.*, 2007; Moyer *et al.*, 2006). Auch für MCM8 haben sich bereits Hinweise ergeben, dass das Protein an der Replikation der DNA beteiligt ist. Die Expression von humanem MCM8 ist zellzyklusabhängig reguliert (Gozuacik *et al.*, 2003), es interagiert mit Komponenten des präreplikativen Komplexes sowie des Initiationskomplexes (Johnson *et al.*, 2003; Kinoshita *et al.*, 2008; Volkening & Hoffmann, 2005) und besitzt in *Xenopus* Helikase- sowie DNA-abhängige ATPase-Aktivität (Maiorano *et al.*, 2005). Die Depletion von humanem sowie *Xenopus* MCM8 führt zu einer Verlangsamung der DNA-Replikation (Maiorano *et al.*, 2005; Volkening & Hoffmann, 2005), außerdem bewirkt die Depletion in *Drosophila* ein beinahe komplettes Ausbleiben der meiotischen Rekombination (Blanton *et al.*, 2005; Matsubayashi & Yamamoto, 2003). Darüber hinaus ist noch wenig über die Rolle von MCM8 im Zellzyklus oder potenzielle Interaktionspartner bekannt, humanes MCM8 wurde bisher *in vitro* noch nicht untersucht. Da humanes MCM8 durch sein gehäuftes oder mutiertes Auftreten in Tumorzellen möglicherweise als Tumormarker für die Krebsforschung dienen könnte (Freeman *et al.*, 1999; Gozuacik *et al.*, 2003; Johnson *et al.*, 2003), ist die Erforschung der Funktion des Proteins im Zellzyklus von großer Wichtigkeit.

Zur Untersuchung von rekombinantem MCM8 *in vitro* ist es unerlässlich, ausreichende Mengen an nativem Protein herzustellen und aufzureinigen. Da eine hohe Überexpression von rekombinanten humanen Proteinen aufgrund einer möglichen Toxizität in humanen Tumorzelllinien schwierig ist und die endogene Expression von MCM8 nicht die für *in vitro*-Untersuchungen benötigten Mengen an Protein liefert, war die Verwendung eines fremden Wirtsorganismus für die Überexpression von MCM8 erforderlich. Hier war es wichtig, das geeignete Expressionssystem zu finden, um humanes MCM8 löslich zu exprimieren und anschließend das lösliche rekombinante Protein mittels verschiedener Chromatographiemethoden aufzureinigen. Daher wurde die Expression von MCM8 im prokaryotischen System *Escherichia coli* und in den eukaryotischen Systemen *Saccharomyces cerevisiae* sowie Sf9- und High Five-Insektenzellen untersucht.

4.1. Expression von MCM8 in *E. coli*

4.1.1. Humanes MCM8 wird in *E. coli* bei Coexpression von *E. coli* Triggerfaktor und einer kühlen Expressionstemperatur löslich exprimiert

Da MCM8 sowie andere humane und archaeale MCM-Proteine bereits erfolgreich in *Escherichia coli* exprimiert wurden (Fletcher *et al.*, 2005; Gozuacik *et al.*, 2003; Yabuta *et al.*, 2003), wurden zur Expression diverser Varianten von rekombinantem MCM8 verschiedene Expressionssysteme in *E. coli*

getestet. Die Expression eukaryotischer Proteine in Bakterienzellen kann problematisch sein, da hier die in eukaryotischen Zellen durchgeführten posttranslationalen Modifikationen sowie Proteinprozessierungsschritte nicht stattfinden und die Verwendung der Codons für die Aminosäuren sich von derjenigen in eukaryotischen Zellen unterscheidet. Daher wurden die Expressionsstämme *E. coli* BL21 (DE3) CodonPlus bzw. Rosetta 2 (DE3) pLysS verwendet, da diese durch zusätzliche tRNAs die in *E. coli* seltenen vorkommenden Codons komplettieren.

Es zeigte sich, dass die Expression von MCM8 in den verwendeten Stämmen sehr gering ist und dass das Protein bei einer Expressionstemperatur von 37°C komplett unlöslich in Einschlusskörperchen, den so genannten *Inclusion Bodies* vorliegt. Dies kann dadurch erklärt werden, dass während der Elongation am Ribosom hydrophobe Polypeptidketten häufig aggregationsanfällige Konformationen einnehmen, da die Einlagerung von hydrophoben Resten während der Faltung der Polypeptidkette üblicherweise 100-300 Aminosäuren als autonome Faltungseinheit beansprucht (Young *et al.*, 2004). Der Anteil an hydrophoben Aminosäuren in MCM8 ist mit 48% relativ hoch und die hydrophoben Reste sind gleichmäßig über die gesamte Aminosäuresequenz verteilt. Bei den Faltungsintermediaten der Polypeptidkette von MCM8 direkt nach Austritt aus dem Austrittskanal des Ribosoms liegen wahrscheinlich die normalerweise im Inneren des Proteins gelegenen hydrophoben Seitenketten exponiert vor, was bei der Expression von MCM8 in einem heterologen Organismus zur Aggregation des rekombinanten Proteins führt. Aus diesem Grund wurde zunächst die Expressionstemperatur erniedrigt, da gezeigt werden konnte, dass dies eine erhöhte Löslichkeit rekombinant exprimierter Proteine bewirken kann (Kopetzki *et al.*, 1989; Schein, 1989; Schein, 1988). Die Löslichkeit von MCM8 in *E. coli* konnte für die getesteten MCM8-Varianten durch eine Expression bei Raumtemperatur bzw. bei 15°C leicht erhöht werden. Der positive Einfluss der niedrigen Expressionstemperatur auf die Löslichkeit des Proteins dadurch erklärt werden, dass bei niedrigeren Temperaturen alle Prozesse der Genexpression langsamer ablaufen und damit die Proteinsyntheserate geringer ist. Hierdurch werden die zelleigenen Faltungshelfer, die so genannten Chaperone, nicht durch eine zu hohe Menge an rekombinantem Protein überbeansprucht und die Polypeptidkette hat mehr Zeit, sich in die korrekte Konformation zu falten. Andererseits ist bei niedrigeren Temperaturen möglicherweise die native Struktur von MCM8 stabiler.

Um MCM8 effektiv aufzureinigen zu können, war es jedoch erforderlich, die Menge an löslich exprimiertem MCM8 weiter zu erhöhen. Es ist bekannt, dass die Erhöhung der Menge der Chaperone durch Co-Expression mit dem Zielprotein ebenfalls die Löslichkeit rekombinanter Proteine bei der Expression in *E. coli* erhöhen kann (Bukau *et al.*, 2006; Mogk, 2001). Beim Austritt von naszierenden Ketten aus dem Austrittskanal am Ribosom werden diese durch die Chaperone in einem nicht-aggregierten, faltungsfähigen Zustand stabilisiert, bis die cotranslationale Faltung einer Domäne oder die posttranslationale Faltung des kompletten Proteins in die native tertiäre Struktur stattgefunden hat (Bukau *et al.*, 2000; Frydman, 2001; Hartl & Hayer-Hartl, 2002). Im Cytosol von *Escherichia coli* interagieren naszierende Polypeptidketten zuerst mit dem Triggerfaktor (TF) (Deuerling *et al.*, 1999; Hestekamp & Bukau, 1996). TF bindet am Ribosom nahe des Austrittskanals der Polypeptidkette (Kramer *et al.*, 2002) und interagiert hauptsächlich mit kurzen naszierenden Ketten durch Erkennung von Sequenzen, die reich an hydrophoben Aminosäureresten sind (Hestekamp & Bukau, 1996; Patzelt *et al.*, 2001; Valent *et al.*, 1995). In dieser Arbeit konnte die Löslichkeit von MCM8 durch eine

gemeinsame Expression mit Chaperonen im Expressionsstamm *E. coli* BL21 (DE3) weiter erhöht werden. Hierbei erwies sich die Co-Expression des *E. coli* Triggerfaktors bei einer Expressionstemperatur von 15°C am effektivsten.

4.1.2. Aufreinigung von humanem MCM8 aus *E. coli*-Zellextrakten und Co-Aufreinigung von Proteolysefragmenten

Lösliches MCM8 konnte in den Varianten H6_MCM8 sowie MCM8_H6 mittels Talon-Affinitätschromatographie und anschließender Ionenaustauschchromatographie aufgereinigt werden. Bei der Affinitätschromatographie befand sich ein großer Teil des Proteins im Säulendurchfluss, was darauf hindeutet, dass beide Tags für die Aufreinigung nur eingeschränkt zugänglich sind. Möglicherweise werden die N- und C-terminalen Enden bei einer nativen Faltung des Proteins im Inneren der Proteinstruktur eingeschlossen. Zudem kam es durch die Affinitäts-Chromatographie zu der Co-Aufreinigung eines C-terminalen bzw. N-terminalen Proteolysefragments, welches auch durch die anschließende Trennung mittels einer Ionenaustausch- bzw. Heparin-Chromatographie sowie einer Glyceringradientenzentrifugation nicht vom Volllängenprotein zu separieren war. Die entsprechenden Proteolysefragmente konnten bereits nach der Expression von MCM8 in den *E. coli* Zellextrakten identifiziert werden. Dieses Ergebnis wird durch eine Arbeit unterstützt, in der ähnliche Proteolysefragmente für MCM8 nach der Expression in *E. coli* beobachtet wurden (Volkning & Hoffmann, 2005). Den in der vorliegenden Arbeit verwendeten BL21- bzw. BL21-derivaten Expressionsstämmen fehlen die cytoplasmatische Protease Lon und die Äußere-Membran-Protease OmpT, wodurch die in diesen Stämmen exprimierten heterologen Proteine verminderter Proteolyse ausgesetzt sind. In *E. coli* existieren jedoch noch weitere Proteasen (Goldberg *et al.*, 1981; Maurizi, 1992), welche in der äußeren Membran, im Periplasma, in der inneren Membran sowie im Cytoplasma lokalisiert sind, und die auch in den verwendeten Protease-defizienten Stämmen aktiv sind. Die bei der Expression von MCM8 in *E. coli* beobachteten Proteolysefragmente bestehen aus einem N-terminalen, ca. 50 kDa großen Fragment und einem C-terminalen, ca. 75 kDa großen Fragment (Abb. 4.1). Es ist wahrscheinlich, dass es sich bei der Proteolysestelle um eine oder mehrere exponierte Sequenzen im Bereich zwischen den Aminosäureresten 170 und 460 handelt. Vergleicht man die Sequenz in diesem Bereich mit der Sequenz von SsoMCM, dessen Struktur bereits aufgelöst ist (Brewster *et al.*, 2008), so ist zu erkennen, dass im Bereich der vorgeschlagenen Proteolysestellen von MCM8 in SsoMCM eine exponierte Sequenz liegt, die den Linker zwischen der N-terminalen und der C-terminalen Domäne bildet (Abb. 4.1, siehe auch Abb. 1.6). Die Proteolyse von MCM8 in diesem Bereich lässt vermuten, dass diese Sequenz auch in MCM8 gut für endogene Proteasen zugänglich ist.

Zur Überprüfung der Aktivität von MCM8 wurde das aus *E. coli*-Zellextrakten aufgereinigte Protein auf eine DNA-abhängige ATPase-Aktivität untersucht.

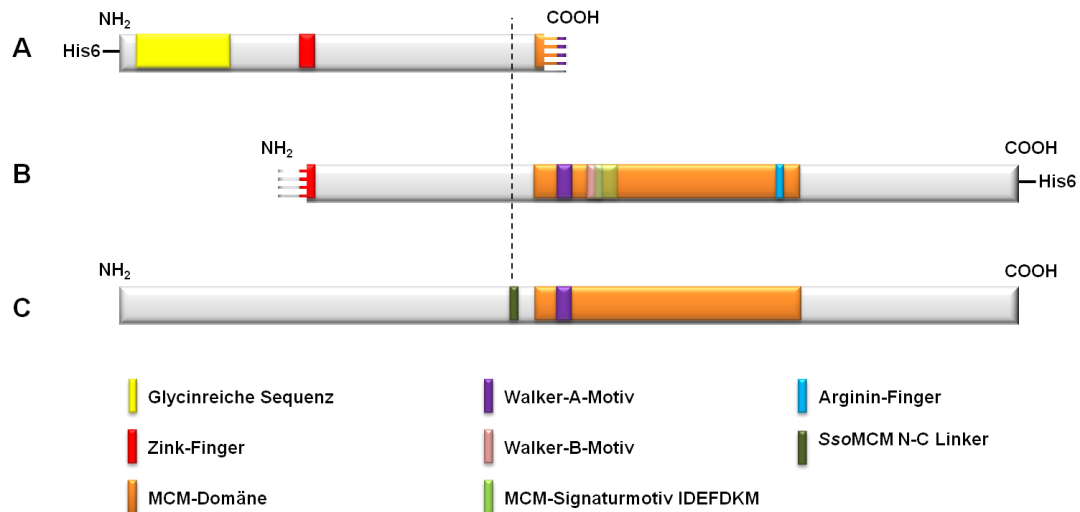


Abb. 4.1 Schematische Darstellung der Proteolysefragmente des humanen MCM8-Proteins in *E. coli*
A: 50 kDa-Fragment von H6_MCM8 (C-terminales Ende nicht bekannt)
B: 75 kDa-Fragment von MCM8_H6 (N-terminales Ende nicht bekannt)
C: Schematische Darstellung der Domänen von SsoMCM (Brewster *et al.*, 2008).
 Eine mögliche Proteolysestelle von MCM8 im Bereich des N-C-Linkers von SsoMCM ist durch eine gestrichelte Linie angezeigt

4.1.3. In *E. coli* exprimiertes humanes MCM8 besitzt keine ATPase-Aktivität

Für die MCM-Proteine aus *Saccharomyces cerevisiae* sowie für die archaealen MCM-Proteine konnte bereits nachgewiesen werden, dass diese in vitro eine ATPase-Aktivität besitzen, welche durch die Gegenwart von DNA stimuliert wird. Für das archaeale *Mth*MCM ergab sich dabei eine 4-11fache Stimulation der Aktivität durch die Zugabe von dsDNA und eine 4-13fache Stimulation durch die Zugabe von ssDNA (Chong *et al.*, 2000; Kasiviswanathan *et al.*, 2004; Kelman *et al.*, 1999; Poplawski *et al.*, 2001). Die Aktivität des MCM4/6/7-Hexamers konnte in Anwesenheit von dsDNA um das 2-8fache, durch die Anwesenheit von ssDNA um das 3-18fache gesteigert werden (Biswas-Fiss *et al.*, 2005; Ishimi, 1997; Lee & Hurwitz, 2001). Auch für *Xenopus laevis* MCM8 (XMCM8) konnte eine Stimulation der ATPase-Aktivität durch DNA nachgewiesen werden (Maiorano *et al.*, 2005).

In dieser Arbeit wurde die Aktivität des humanen MCM8 im Vergleich zu der Walker-A-Motiv-defekten Mutante untersucht, deren konserviertes Lysin K460 durch Glutaminsäure ersetzt wurde. Für SsoMCM konnte gezeigt werden, dass bereits die Mutation dieses Lysins im Walker-A-Motiv zur kompletten Unterbindung der ATPase-Aktivität von SsoMCM führt (Moreau *et al.*, 2007). Für MCM2-7 wurde ebenfalls gezeigt, dass nur eine einzige Mutation in einem der sechs Walker-A-Motive ausreicht, um die ATPase-Aktivität des gesamten Komplexes um 85-96% zu reduzieren (Schwacha & Bell, 2001). Auch in XMCM8 wurde durch Ersetzen des konservierten Lysins im Walker-A-Motiv die ATPase- sowie die Helikaseaktivität ausgeschaltet (Maiorano *et al.*, 2005). Das humane MCM8-Protein teilt 74% Sequenzidentität und 16% Sequenzähnlichkeit mit XMCM8, was auf eine analoge Funktion der beiden Proteine schließen lässt. Die Identität der beiden Proteine in der MCM-Domäne beläuft sich auf 93% (Abb. 4.2), was bedeutet, dass die aktiven Zentren beider Proteine nahezu identisch sind.

Die Aktivität des humanen MCM8-Proteins wurde im Vergleich mit der Walker-A-Motiv-defekten Mutante MCM8 K460E untersucht. Hier wurde ebenfalls das konservierte Lysin im Walker A-Motiv durch Glutaminsäure ersetzt (GDPGLGKS → GDPGLGES). Falls MCM8 ATPase-Aktivität besitzt, sollte diese in MCM8 K460E ausbleiben.

In den ATPase-Assays von MCM8 und MCM8 K460E wurde eine leichte ATPase-Aktivität detektiert, die zwar durch DNA-Zugabe stimuliert, jedoch MCM8 nicht zugeordnet werden konnte. Außerdem trat diese Aktivität auch bei der ATPase-Motiv-defekten Mutante auf. Möglicherweise reicht die Mutation des konservierten Lysins nicht aus, um die Funktion des humanen MCM8 zu deletieren. Dies ist jedoch unwahrscheinlich, da dieses Lysin essentiell für die Nukleotidbindung ist und AAA⁺-Proteine im Allgemeinen durch dessen Mutation inaktiviert werden (Hanson & Whiteheart, 2005). Die hier gewonnenen Daten lassen darauf schließen, dass die detektierte ATPase-Aktivität vermutlich auf eine Kontamination durch fremde Proteine zurückzuführen war, während für MCM8 keine Aktivität gezeigt werden konnte. Ein möglicher Grund für die Funktionsuntüchtigkeit von MCM8 könnte sein, dass durch die Aufreinigung das Volllängenprotein nicht von den MCM8-Proteolysefragmenten abgetrennt werden konnte. Wenn die verkürzten Proteolysefragmente in der Lage sind zu hexamerisieren, stören sie möglicherweise die vermutlich notwendige Hexamerisierung von sechs Volllängen-MCM8-Proteinen, so dass in Anwesenheit der Proteolysefragmente kein vollständiges und somit funktionsfähiges MCM8-Hexamer gebildet werden kann.

Eventuell benötigt MCM8 aber auch posttranslationale Modifikationen wie Glykosylierungen oder Phosphorylierungen für die Entfaltung seiner Aktivität. MCM8 besitzt sechs potentielle Phosphorylierungsstellen mit der Erkennungssequenz S/TP, die von der cyclin-abhängige-Kinase (CDK) erkannt werden. Vier dieser Phosphorylierungsstellen befinden sich in der N-terminalen Domäne und zwei in der C-terminalen Domäne (Abb. 4.2). Auch der MCM2-7-Komplex in *S. cerevisiae* benötigt für seine Aktivierung Phosphorylierungen durch die Dbf-abhängige Kinase (DDK) (Lee *et al.*, 2003; Randell *et al.*, 2010). Phosphorylierungen der humanen Proteine MCM2 und MCM4 durch die DDK an ähnlichen Stellen wurde ebenfalls beobachtet (Masai *et al.*, 2006; Montagnoli *et al.*, 2006). Solche Modifikationen finden im prokaryotischen System von *E. coli* nicht statt. Daher wurde die Expression, Aufreinigung und Aktivität von humanem MCM8 im eukaryotischen System der Insektenzellen untersucht.

MCM8_HUMAN	MNGEYRGRGFRGRFQSWKRGGGNFGSKWREREHRPDLSTTKGRTSEQ	TFQFLSTK	60	
MCM8_Xenopus	-----RDPVCFAPPK		10	
		: * : ..*		
MCM8_HUMAN	TFQSMQSTLDRFIPYKGWKLYFSEVYSDS	SPLIEKIQAFEKFFTRHIDLKDEIERKGS	120	
MCM8_Xenopus	-PQLTQTTLDKYIPYKGWKLYFSEAYSDN	SPLFLEKVRAFEKFFKKQIELYDKDEIERKGS	69	
	** *:***:*****.***.*:***:*****.:*:*****			
MCM8_HUMAN	ILVDFKELTEGGEVTNLPDIATELRLDAPEKTLACMGLAIHQVLTKDLERHAAELQAQEG		180	
MCM8_Xenopus	ILVDYKELLQDEDLSAAIP-LSELKDMPEKVLCEMGLAIHQVLTKDLTHAADLQQQEG		128	
	****:***.:.: **::*: * **.* ***** ***:** **			
MCM8_HUMAN	LSNDGETMVNVPHIHARVYNYEPLTQLKNVRANYYGKYLALRGTVVRVSNIKPLCTKMAF		240	
MCM8_Xenopus	LRTEEAPIVNVPHIHARVFNHYDTLTSKLNLRASLYGKVALRGTVVRVGNIKPLCTKMAF		188	
	.: ::***.*****:*.**.*:*. *****:*****.*****			
MCM8_HUMAN	LCAACGEIQSFPLPDGKYSPLTKCPVPVCRGRSFTALRS	SPLTVTMDWQSIKIQELMSDD	300	
MCM8_Xenopus	SCNMGCDIQCFPLPDGKYTVPTKCPVPECRGRSFTANRS	SPLTVTVDWQTIKVQELMSDD	248	
	* **.*.*****.:***** ***** *****:***.*:*****			
MCM8_HUMAN	QREAGRIPRTIECELVDHLDVDSVPGDVTVTITGIVKVSNAEEG-SRNKNDKCMFLLYIEA		359	
MCM8_Xenopus	QREAGRIPRTVECELIQDLVDSCVPGDMITVTGIVKVSNTDRGGFKNNKCMFLLYIEA		308	
	*****:***.:***** *:*****:.* ***:*****			
MCM8_HUMAN	NSISNSKGQTKSSEDGCKHGLMEFSLKDLYAIEQIAEE	NLFKLIVNSLCPVIFGHEL	419	
MCM8_Xenopus	NSVNSKGQKGKSTEDSGNHGASDMFSLKDLYAIEQIQSQ	NLFQLIVNSLCPTIYGHEL	368	
	*:***** **:*.:* *:*****:*****:***:*****.*:****			
MCM8_HUMAN	VKAGLALALFGGSQKYADDKNRIPIRGDPHILVV	GDPGLGKSQMLQAACNVAPRGVYVCG	479	
MCM8_Xenopus	VKAGLSLALFGGCQKYADDKNRIPIRGDPHILVV	GDPGLGKSQMLQAVCNVAPRGVYVCG	428	
	*****:*****.*****.*****.*****.*****.*****			
MCM8_HUMAN	NTTTTSGTLVTLSKSDSSSGDFALEAGALVLGDQG	ICGIDFDMGNQHQAALLEAMEQQSI	539	
MCM8_Xenopus	NTTTTSGTLVTLSRDTTGDGFLGALVLGDQG	ICGIDFDMGNQHQAALLEAMEQQSI	488	
	*****:***.:*:*****.*****.*****.*****.*****.*****			
MCM8_HUMAN	SLAKAGVVCSLPAR	TSIIAAANPVGGHYNKAKTVSENLMKGSALLS	RFDLVFILLD	599
MCM8_Xenopus	SLAKAGIVCSLPAR	TSIIAAANPVGGHYNKGKTVSENLMKGSALLS	RFDLVFILVD	548
	*****:*****.*****.*****.*****.*****.*****:****			
MCM8_HUMAN	HHDHLLSEHV	IAIRAGKQRTISSATVARMNSQDSNTSVLEVVSSEKPLSERLKVVPGETID	659	
MCM8_Xenopus	DHDHLLSEHV	MAMRSG-AKEIQSVDITRINTQNSNTSILEVPSERPLGERLKRT-GEHFD	606	
	.*****:***:* :*.*.::*:*.*****:*** ***:***. ***:**			
MCM8_HUMAN	PIPHQLLRKYIGYARQYVYPRLSTEAAVLQDFYLELRKQSQRLN	SPFITTRQLESILRL	719	
MCM8_Xenopus	ALPHQLLRKFVGYARQYVHPSLSPDAAQILQDFYLELRKQNQGID	SPFITTRQLESILRL	666	
	.:*****:*****:* **.*:***:*****.*.:*:*****			
MCM8_HUMAN	TEARARI	ELREEATKEDAEDIVEIMKYSLGTYSDEFGNLDFERSQHSGSMNRSTAKRF	779	
MCM8_Xenopus	TEARARI	ELREKATKEDAEVVQIMKYSLGTFSDEFGKLDQRSQHSGSMNRSKAKKF	726	
	*****:*****:.*:*****:***:*****:***:*****.***:*			
MCM8_HUMAN	ISALNNVAERTYNNIFQFHQLRQIAKELNIQVADFENFIGSLNDQGYLLKKGPKVYQLQT		839	
MCM8_Xenopus	VSALNRVAEQTYNNLFEFQQLRQIARELQIQVIDFEAFIGSLNDQGYLLKKGPRVFQLQT		786	
	:***.**:***:*.*:*****:***:*** ***** *****:***:****			
MCM8_HUMAN	M 840			
MCM8_Xenopus	M 787			
	*			

Farbcode: gelb – MCM-Domäne; grün – Walker-A-Motiv; hellblau – Walker-B-Motiv; fett+unterstrichen – MCM-Motiv; dunkelbau – Sensor-1-Motiv; rot – Arginin-Finger; pink – Sensor-2-Motiv; grau – Cysteine des Zink-Finger-Motivs; schwarz – CDK-Phosphorylierungsstellen Consensus S/TP. Das Alignment wurde mit ClustalW erstellt.

4.2. Expression von humanem MCM8 in Insektenzellen

4.2.1. Humanes MCM8 wird in Insektenzellen löslich exprimiert

Die Expression von MCM8 in Insektenzellen wurde gewählt, da hier säugerähnliche Glykosylierungen oder Phosphorylierungen durchgeführt werden, welche MCM8 möglicherweise zur Entfaltung seiner Aktivität benötigt. Die Glykosylierungen in Insektenzellen unterscheidet sich zwar in einigen Punkten von denen in Säugerzellen, jedoch wurden die Proteine MCM4, MCM6 und MCM7 aus der Maus (You *et al.*, 2002) sowie die MCM-Proteine aus *S. cerevisiae* bereits erfolgreich in Insektenzellen exprimiert und *in vitro* untersucht (Bochman *et al.*, 2008; Bochman & Schwacha, 2008; Schwacha & Bell, 2001). Ebenfalls wurden erfolgreich *in vitro*-Studien an XMCM8 durchgeführt, welches in Insektenzellen exprimiert wurde (Maiorano *et al.*, 2005).

Zur Expression von humanem MCM8 in Insektenzellen wurden zwei verschiedene Expressionssysteme verwendet. Zum einen wurde MCM8 transient mit Hilfe des Plasmid-basierten Expressionssystems pIEx-1 in Sf9-Zellen exprimiert, zum anderen wurde eine Baculovirus-vermittelte Expression in *High Five*-Insektenzellen durchgeführt.

Die transiente Expression besaß den Vorteil, dass hier im Vergleich zur Baculovirus-vermittelten Expression das rekombinante Protein innerhalb eines Zeitraumes von wenigen Tagen untersucht werden konnte, wohingegen die Herstellung eines Expressions-kompetenten Baculovirus-Stocks oft mehrere Wochen in Anspruch nahm. Allerdings ermöglichte die Expression mit Hilfe des Baculovirus-Systems einen Einsatz größerer Kulturvolumina und eine höhere Ausbeute an rekombinantem Protein als die transiente Expression. Daher eignete sich die transiente Expression gut als Screening-Methode zur Überprüfung von Expression und Löslichkeit des rekombinanten MCM8, wohingegen die Expression mittels Baculovirus die für eine *in vitro*-Untersuchung des Proteins erforderlichen Mengen an rekombinantem Protein lieferte. Humanes MCM8 konnte in Sf9- und *High Five*-Insektenzellen sowohl mit dem transienten Plasmid-Expressionssystem pIEx-1 als auch mittels Expression durch einen Baculovirus löslich exprimiert werden.

4.2.2. Aufreinigung von humanem MCM8 aus Insektenzell-Extrakten

Aus Sf9-Zellextrakten der transienten MCM8-Expression konnte H10_MCM8 mittels Ni-NTA-Chromatographie aufgereinigt werden. Die Ausbeute an H10_MCM8 war jedoch aufgrund der limitierten Größe der transienten Expressionsansätze sehr gering und konnte nur mittels Western-Blot nachgewiesen werden.

Aus *High Five*-Zellextrakten der Baculovirus-vermittelten Expression konnte Strep_MCM8_H10 mittels Strep-Tactin-Chromatographie bzw. Talon-Chromatographie mit anschließender Heparin-Chromatographie aufgereinigt werden. Strep_MCM8_H10 zeigte nach der Aufreinigung mittels Strep-Tactin-Chromatographie bereits eine hohe Reinheit, weshalb hier kein zusätzlicher Aufreinigungsschritt notwendig war. Die hier gewonnenen Proteinmengen waren zwar gering, da das meiste Protein sich im Säulendurchfluss befand. Die Ausbeute war jedoch höher als bei der

transienten Expression von MCM8. Wurde das Protein mittels Talon-Chromatographie aufgereinigt, war die Ausbeute an MCM8 höher als bei der Aufreinigung mittels Strep-Tactin. Allerdings befand sich auch hier ein großer Teil des rekombinanten Proteins im Säulendurchfluss. Wahrscheinlich sind hier wie bei dem in *E. coli* exprimierten Protein beide Tags nur eingeschränkt für eine Aufreinigung zugänglich. Außerdem ist bei dem in Insektenzellen exprimierten Protein der C-terminale His-Tag vermutlich besser für eine Aufreinigung zugänglich, als der N-terminale Strep-Tag. Wahrscheinlich ist der C-terminale His-Tag teilweise auf der Oberfläche des Proteins exponiert, während der N-terminale Strep-Tag eher im Inneren des Proteins maskiert ist.

Außerdem zeigte sich nach der Talon- sowie der anschließenden Heparin-Chromatographie von Strep_MCM8_H10 im Coomassie-gefärbten SDS-Gel eine Doppelbande von MCM8. Von diesen beiden Banden war jedoch nur die dem größeren Molekulargewicht entsprechende Bande im Western-Blot nachweisbar. Dies ließ darauf schließen, dass humanes MCM auch in Insektenzellen N-terminaler Proteolyse unterworfen ist. Mittels Strep-Tactin-Chromatographie wurde nur das Volllängenprotein aufgereinigt, da dieses noch den N-Terminus mit dem Strep-Tactin-Epitop besitzt. In der Affinitätschromatographie über den His-Tag am C-Terminus des Proteins wurden sowohl das Volllängenprotein als auch das Proteolysefragment aufgereinigt, wobei das Proteolysefragment aufgrund des Verlustes des N-Terminus mit dem Strep-Tag im Western-Blot durch die Detektion mit Strep-Tactin-AP nicht nachweisbar war.

4.2.3. In Insektenzellen exprimiertes humanes MCM8 besitzt keine ATPase-Aktivität

Bei einer Untersuchung des mittels Strep-Tactin bzw. Talon- und anschließender Heparin-Chromatographie gereinigten Strep_MCM8_H10 konnte keine ATPase-Aktivität oder eine Stimulierung der ATPase-Aktivität durch Zugabe von ssDNA oder dsDNA detektiert werden.

In Insektenzellen wurde ähnlich wie in *E. coli* eine Proteolyse des N-Terminus beobachtet, wobei sich diese hier auf einen Verlust von ca. 10 kDa am N-terminus beschränkt. Dies bedeutet bei Strep_MCM8_H10 ungefähr den Verlust der ersten 100 Aminosäuren. Möglicherweise erschwert dies auch hier die Formierung eines funktionstüchtigen MCM8-Hexamers. Da jedoch die von MCM8 erwartete Aktivität auch bei dem mittels Strep-Tactin ohne Proteolysefragment aufgereinigten Protein nicht detektiert wurde, ist es wahrscheinlich, dass das Ausbleiben der ATPase-Aktivität von MCM8 nicht auf den störenden Einfluss eines Proteolysefragments zurückzuführen ist.

Die Ergebnisse der Untersuchungen von MCM8 aus der Expression in *E. coli* und Insektenzellen führten zu der Schlussfolgerung, dass MCM8 *in vitro* keine ATPase-Aktivität besitzt.

Da MCM2-7 für die Entfaltung seiner Helikaseaktivität *in vivo* Cofaktoren benötigt, liegt die Vermutung nahe, dass MCM8 möglicherweise auch einen oder mehrere Interaktionspartner benötigt, um seine Aktivität zu entfalten bzw. seine Quartärstruktur einzunehmen, das heißt zu hexamerisieren.

4.3. Interaktion von MCM8 und CDC45

Für die Funktion des CMG-Helikasekomplexes der Eukaryoten ist eine Interaktion von MCM2-7 mit den Helikase-Cofaktoren CDC45 und GINS essentiell (Ilves *et al.*, 2010; Moyer *et al.*, 2006; Tercero *et al.*, 2000). Eine Interaktion von MCM8 mit verschiedenen Komponenten des pre-RC sowie der DNA-Replikation sind bereits bekannt (Johnson *et al.*, 2003; Kinoshita *et al.*, 2008; Volkening & Hoffmann, 2005). Sollte MCM8 als Helikase in die eukaryotische DNA-Replikation involviert sein, ist es wahrscheinlich, dass MCM8 analog zu MCM2-7 mit CDC45 interagiert.

4.3.1. MCM8 und CDC45 co-eluierten in Affinitätschromatographie

Zur Überprüfung einer möglichen Interaktion von MCM8 und CDC45 wurde die rekombinanten humanen Proteine Strep_MCM8 und His_CDC45 in High-Five-Insektenzellen co-exprimiert. Die Zellextrakte wurden mittels Talon- und anschließender Strep-Tactin-Chromatographie aufgereinigt, wobei beide Proteine von beiden Chromatographiematerialien nacheinander co-eluiert wurden. Da His-CDC45 aufgrund des fehlenden Strep-Tags alleine nicht in der Lage war, an die Strep-Tactin-Matrix zu binden, war eine Bindung an Strep-Tactin und die nachfolgende Co-Elution mit Strep_MCM8 nur über eine Interaktion mit Strep_MCM8 möglich. Durch die starke Verdünnung der Proteinlösung konnte die Interaktion nur mittels Western-Blot nachgewiesen werden. Eine Bestimmung der Proteinkonzentration und der Reinheit der Proteine per Coomassie-Färbung war zwar nicht möglich, und die hier gewonnene Menge beider Proteine war für weitere Experimente zu gering. Jedoch muss die Interaktion von Strep_MCM8 und His_CDC45 relativ stark sein, da sie trotz der starken Verdünnung des Zellextraktes, welche durch die Aufreinigung über zwei Säulen nacheinander entsteht, bestehen bleibt.

4.3.2. MCM8 und CDC45 co-eluierten in Gelfiltration

Zur weiteren Überprüfung der Interaktion von MCM8 und CDC45 wurde die rekombinanten humanen Proteine MCM8_H10 und CDC45 in High-Five-Insektenzellen co-exprimiert und die Zellextrakte mittels DEAE-Chromatographie vorgereinigt, um einen Überschuss an fremdem Protein sowie die im Zellextrakt enthaltene DNA aus dem Extrakt zu entfernen. In der DEAE-Vorreinigung des Zellextraktes ergab sich für MCM8 ein breites Elutionsprofil von 200-700 mM NaCl, während die Co-Elution von MCM8_H10 und CDC45 in einem Konzentrationsbereich von 300-500 mM NaCl detektiert wurde. Da davon ausgegangen wird, dass MCM8 DNA binden kann, wurde möglicherweise die Elution von MCM8_H10 dadurch verzögert, dass das Protein einen Teil der im Zellextrakt vorhandenen DNA gebunden hatte. Chromosomale DNA und tRNA sind aufgrund ihres polyanionischen Charakters sehr stark an die Säule gebunden und erfordern hohe Salzkonzentration (1-1,25 M NaCl) zur Elution (Qiagen Plasmid Purification Handbook, 2005). Daher kann davon ausgegangen werden, dass sich in den Eluaten von MCM8 und CDC45 aufgrund ihrer starken Bindung an das Säulenmaterial keine

längeren DNA-Fragmente befinden sollten, welche den Lauf der Proteine in der Gelfiltration beeinträchtigen könnten. Anschließend wurden die Co-Elutionsfraktionen von MCM8_H10 und CDC45 mittels Superose12-Gelfiltration aufgetrennt.

In der Gelfiltration der MCM8_H10/CDC45-Elutionsfraktionen ergab sich ein breites Elutionsprofil, welches zwei deutliche Peaks bei 240 kDa bzw. 70-100 kDa zeigte. Für keines der jeweiligen Proteine war eine abgrenzbare Molekulargewichtsspezies erkennbar. Eine Analyse der Elutionsfraktionen mittels Western-Blot ergab eine Akkumulation von MCM8_H10 und CDC45 im Peak von 240 kDa. Für CDC45 ergab sich zusätzlich eine gleichmäßige Verteilung über das gesamte Elutionsprofil, was möglicherweise auf eine Aggregation oder unspezifische Interaktion mit dem Säulenmaterial zurückzuführen ist.

Das gemeinsame Auftreten von MCM8_H10 und CDC45 im Peak von 240 kDa lässt vermuten, dass es sich hier um einen Komplex aus MCM8_H10 und CDC45 handelt. Um jedoch eine genauere Aussage über das Laufverhalten der einzelnen Proteine in der Gelfiltration treffen zu können und auszuschließen, dass es sich nicht um Aggregate der Proteine oder unspezifische Interaktion mit dem Säulenmaterial handelt, sollten zusätzlich separate Gelfiltrationsexperimente mit MCM8_H10 bzw. CDC45 durchgeführt werden. Genaue Aussagen über die Stöchiometrie des möglichen Komplexes aus MCM8_H10 und CDC45 können hier nicht getroffen werden, da dafür die Trennleistung von Superose12 diesem Bereich molekularer Masse nicht ausreicht.

4.3.3. MCM8 und CDC45 co-immunopräzipitieren

Zur weiteren Untersuchung der Interaktion von MCM8 und CDC45 wurden die rekombinanten humanen Proteine MCM8_H10 und CDC45 in High-Five-Insektenzellen co-exprimiert und mittels verschiedener MCM8- bzw. CDC45-Antikörper präzipitiert. Außerdem wurde eine Immunopräzipitation von MCM8 und CDC45 aus logarithmisch wachsenden HeLa-Zellextrakten durchgeführt, um einen Hinweis auf eine *in vivo*-Interaktion von MCM8 und CDC45 zu erhalten.

In HeLa-Zellen konnte eine Co-Immunopräzipitation von CDC45 mit anti-MCM8 (full)-Antikörper nachgewiesen werden. Eine Immunopräzipitation von MCM8 selbst wurde jedoch nicht detektiert. Dies lässt darauf schließen, dass möglicherweise die Affinität der für die Co-IP verwendeten Antikörper für MCM8 nicht hoch genug ist, und damit die Menge an präzipitiertem MCM8 unterhalb der Nachweisgrenze der Western-Blot-Analyse liegt. Möglicherweise sind auch die verwendeten Detektionsantikörper zum Nachweis von MCM8 nach der verwendeten Präparationsmethode nicht geeignet. Für die in High-Five-Insektenzellen exprimierten rekombinanten Proteine konnte jedoch eindeutig nachgewiesen werden, dass sie mit dem jeweiligen Interaktionspartner co-immunopräzipitieren. Daher ist eine Interaktion von MCM8 und CDC45 auch *in vivo* wahrscheinlich.

4.3.4. MCM8 und CDC45 assoziieren in der späten Synthese-Phase am Chromatin

Um eine zeitliche Korrelation des Auftretens von MCM8 und CDC45 im Hinblick auf die Chromatinbindung im humanen Zellzyklus zu untersuchen, wurden synchronisierte HeLa-Zellen verwendet. Hier wurden die löslichen und chromatingebundenen Proteine separat präpariert und gaben somit Aufschluss über ein eventuelles verstärktes Auftreten der jeweiligen Proteine in den entsprechenden Zellkompartimenten während der G1-Phase, zu verschiedenen Zeitpunkten der Synthese-Phase oder am Übergang der G2 zur Mitose-Phase.

Es konnte gezeigt werden, dass MCM8 und CDC45 im Zellzyklus von HeLa-Zellen in Korrelation in der späten Synthesephase auftreten. Im Gegensatz dazu wurde MCM2 verstärkt zu Beginn der Synthesephase detektiert. MCM2 ist ein Bestandteil des MCM2-7-Komplexes, welcher an der Initiation der DNA-Replikation beteiligt ist (Ishimi *et al.*, 2001; Maiorano *et al.*, 2005; Yan *et al.*, 1993). Ähnliche Beobachtungen wurden für die homologen Proteine aus *Xenopus laevis* gemacht (Maiorano *et al.*, 2005), und auch für das humane MCM8 wurde bereits eine Chromatinbindung in der späten S-Phase gezeigt (Gozuacik *et al.*, 2003). Die gleichzeitige Bindung von MCM8 und CDC45 ans Chromatin ist ein weiterer Hinweis auf eine Interaktion der beiden Proteine *in vivo* und der Involvierung von MCM8 in der DNA-Replikation.

4.4. Die Funktion von MCM8 im eukaryotischen Zellzyklus

Die hier gewonnenen Daten zeigen, dass MCM8 unter den gewählten experimentellen Bedingungen *in vitro* keine enzymatische ATPase-Aktivität besitzt. Außerdem konnte gezeigt werden, dass MCM8 *in vitro* und vermutlich auch *in vivo* mit dem Helikase-Cofaktor CDC45 interagiert.

Die exakte Rolle von MCM8 im eukaryotischen Zellzyklus oder anderen Mechanismen verbleibt unklar und wurde bisher auch von keiner anderen Arbeitsgruppe aufgeklärt. Es ist durchaus möglich, dass MCM8 als Helikase an der eukaryotischen DNA-Replikation beteiligt ist. Sollte dies der Fall sein, sprechen die Beobachtungen aus synchronisierten HeLa-Zellen für die Hypothese, dass MCM8 vermutlich eher an der Elongation während der DNA-Replikation beteiligt ist (Maiorano *et al.*, 2005) und nicht wie anderweitig gezeigt an der Initiation (Volkening & Hoffmann, 2005), da hier gezeigt wurde, dass MCM8 erst in der späten Synthesephase und am G2/M-Phase-Übergang verstärkt Chromatingebunden vorliegt. Es ist zudem nicht auszuschließen, dass MCM8 für die Ausübung seiner Funktion außer CDC45 noch weitere Interaktionspartner wie z.B. GINS benötigt.

Des Weiteren könnte MCM8 außer als Helikase in anderer Funktion in die DNA-Replikation involviert sein. Es wurde bereits gezeigt, dass MCM8 mit MCM4, MCM6 und MCM7 interagiert (Johnson *et al.*, 2003). Die Proteine MCM4/6/7 sind in der Lage, auch ohne MCM2, MCM3 und MCM5 zu hexamerisieren und Helikaseaktivität zu entwickeln (Ishimi, 1997; Kaplan *et al.*, 2003; You *et al.*, 2002), während MCM2, MCM3 und MCM5 als negative Regulatoren im MCM2-7-Komplex dienen (Sato *et al.*, 2000; Schwacha & Bell, 2001). Es wäre denkbar, dass auch MCM8 die Funktion eines solchen Regulators im MCM2-7-Komplex übernimmt. Zusätzlich für diese Hypothese sprechen die in dieser Arbeit gezeigte Interaktion mit CDC45 und die Chromatinbindung von MCM8 und CDC45 in der

späten Synthesephase. Möglicherweise ist MCM8 gegen Ende der DNA-Replikation in Konformationsänderungen des MCM2-7-Komplexes involviert oder ersetzt eines der sechs anderen MCM-Proteine. Die Rolle von MCM8 als Regulatorprotein würde auch seine fehlende Aktivität *in vitro* erklären.

Außerhalb der Beteiligung in der DNA-Replikation konnte für MCM2 und MCM3 gezeigt werden, dass sie durch Interaktion mit der RNA-Polymerase II und generellen Transkriptionsfaktoren (GTFs) in die Transkriptionskontrolle involviert sind (Yankulov *et al.*, 1999). Außerdem benötigt der Transkriptionsaktivator Stat1 eine Interaktion mit MCM3 und MCM5 für die Aktivierung der Transkription (DaFonseca *et al.*, 2001; Snyder *et al.*, 2005; Zhang *et al.*, 1998). Da MCM8 Homologien zu den anderen MCM-Proteinen aufweist und wie diese Chromatin bindet, ist ebenfalls eine Funktion des Proteins in diesem Zusammenhang denkbar.

Möglicherweise ist MCM8 hier auch in die Kontrolle der Zellproliferation involviert. Nicht zuletzt könnte dies auch das gehäufte oder mutierte Auftreten von MCM8 in Tumorzellgeweben erklären (Gozuacik *et al.*, 2003; Johnson *et al.*, 2003). Die Funktion von MCM8 im Zellzyklus aufzuklären ist gerade im Hinblick auf seine mögliche Eignung als Tumormarker von großer Wichtigkeit.

4.5. Ausblick

Um weiter zur Aufklärung der Rolle von MCM8 im eukaryotischen Zellzyklus beizutragen, sollten zusätzlich zu den bereits genannten Vorgehensweisen noch weitere wichtige Untersuchungen folgen:

A Durch Untersuchungen mit rekombinanten Proteinen *in vitro* könnte getestet werden, ob CDC45 und ggf. GINS die ATPase-Aktivität von MCM8 steigern können. Sollte dieses Vorgehen erfolgreich sein, könnten *in vitro*-Untersuchungen der Aktivität von rekombinantem mutierten MCM8 aus Tumor-Geweben durchgeführt werden. Hier wären zum Beispiel Untersuchungen eines in Darmkrebszellen identifizierten MCM8-Proteins interessant, dem 16 Aminosäuren fehlen (Johnson *et al.*, 2003).

B Da in dieser Arbeit MCM8 in den Immunopräzipitaten aus HeLa-Zell-extrakten nicht identifizierbar war, könnte hier die Expression von MCM8 in HeLa Zellen mit Hilfe des eukaryotischen Expressionsvektors pcDNA erhöht werden. Anschließend könnte die Interaktion von MCM8 und CDC45 oder anderen Interaktionspartnern durch Co-Immunopräzipitations- und Gelfiltrationsexperimente *in vivo* weitergehend untersucht werden.

C Ausgehend von synchronisierten HeLa-Zellen der späten Synthese-Phase könnten die Bindungspartnerstudien ausgeweitet werden, indem zum Beispiel Kreuzvernetzungsagenzien (*cross-linker*) eingesetzt werden, um mögliche Interaktionspartner irreversibel an MCM8 zu koppeln. In *Xenopus* konnten dadurch die Interaktionen vieler Komponenten der Mcm2-7-Helikase mit Cdc45 nachgewiesen werden (Mimura *et al.*, 2000). Außerdem könnten in einem proteomischen Ansatz die Immunpräzipitation und die massenspektrometrische Analyse kombiniert werden. Dies kann zur

Identifikation weiterer Interaktionspartner führen, für die noch keine geeigneten Antikörper entwickelt wurden.

D Eine Durchführung von Co-Lokalisationsstudien durch konfokale Immunfluoreszenz-Mikroskopie in G1-Phase-Zellen sowie in Zellen über die gesamte S- und G2/M-Phase ist für eine umfassende Beurteilung des Auftretens von MCM8 und seiner Interaktionspartner sicherlich nötig.

E Das in der Synthese-Phase involvierte MCM8-Protein könnte hinsichtlich posttranslationaler Modifikationen, vor allem im Hinblick auf die möglichen Phosphorylierungsstellen und die potentiell phosphorylierende Kinase analysiert werden. Hierdurch kann ein möglicher aktivierender Effekt dieser Phosphorylierungen auf MCM8 untersucht werden. Außerdem würde dies möglicherweise das Verständnis der Abläufe vor, während und nach der DNA-Replikation erweitern und Prozesse erklären, die sicherstellen, dass jeder DNA-Abschnitt nur einmal pro Synthese-Phase verdoppelt wird.

5. Zusammenfassung

In der eukaryotischen und archaealen DNA-Replikation spielen die MCM-Proteine eine bedeutende Rolle. Ein heterohexamerer Komplex bestehend aus den Proteinen MCM2-7 stellt in eukaryotischen Zellen die replikative Helikase dar, welche den DNA-Doppelstrang entwindet und so für die Replikation durch die DNA-Polymerasen zugänglich macht. In den Archaea übernimmt diese Aufgabe ein homohexamerer MCM-Komplex. Ein weiteres Mitglied der eukaryotischen MCM2-7-Familie ist MCM8. Es gibt Hinweise, dass MCM8 möglicherweise als homohexamere Helikase in der eukaryotischen DNA-Replikation involviert ist, die tatsächliche Funktion des Proteins im Zellzyklus ist jedoch noch weitgehend unbekannt. Durch Untersuchungen von Tumorgewebe wurde gezeigt, dass das humane MCM8-Protein in den Zellen einiger Tumorerkrankungen akkumuliert oder mutiert vorliegt. Dies lässt darauf schließen, dass MCM8 in diesen Fällen an der Entwicklung der Tumoren beteiligt sein könnte. Für das Verständnis der Krebsentstehung ist daher die Erforschung seiner Funktion von großer Wichtigkeit.

Ziel dieser Arbeit war zunächst, ein geeignetes Expressionssystem zu etablieren, in welchem rekombinantes humanes MCM8 löslich exprimiert und aufgereinigt werden kann. Hierfür wurden Expressionsstudien im prokaryotischen System *Escherichia coli* und in den eukaryotischen Systemen *Saccharomyces cerevisiae* sowie Sf9- und High-Five-Insektenzellen durchgeführt. In *S. cerevisiae* konnte keine Expression von MCM8 detektiert werden, da das Protein hier möglicherweise toxisch wirkt. In *E. coli* konnte MCM8 nach einer Co-Expression mit dem Chaperon *E. coli* Triggerfaktor bei einer Expressionstemperatur von 15°C teilweise löslich exprimiert werden. In Insektenzellen konnte MCM8 sowohl in plasmidbasierter transienter Expression als auch in einer Expression mit Hilfe des Baculovirus-Systems vollständig löslich exprimiert werden.

Das lösliche rekombinante MCM8 wurde mittels Affinitäts-, Heparin- sowie Ionenaustauschchromatographie aufgereinigt und auf enzymatische Aktivität untersucht. Es war bekannt, dass die anderen MCM-Proteine eine DNA-abhängige ATPase-Aktivität besitzen, und dass diese durch die Mutation eines konservierten Lysinrests im aktiven Zentrum des Proteins ausgeschaltet werden kann. Um eine eventuelle ATPase-Aktivität MCM8 zuordnen zu können, wurde die Aktivität des Wildtyp-Proteins sowie die Aktivität der mutmaßlichen ATPase-Motiv-defekten Mutante MCM8 K460E überprüft. Weder für das in *E. coli* noch für das in Insektenzellen exprimierte rekombinante Protein konnte eine ATPase-Aktivität nachgewiesen werden. Auch durch Zugabe von Einzel- oder Doppelstrang-DNA konnte diese Aktivität nicht stimuliert werden. Dies ließ darauf schließen, dass humanes MCM8 alleine *in vitro* keine enzymatische Aktivität besitzt.

Vermutlich benötigt MCM8 wie der MCM2-7-Komplex *in vivo* einen oder mehrere Cofaktoren zur Ausübung seiner Funktion. CDC45 und der GINS-Proteinkomplex gelten als essentielle Cofaktoren der Helikase MCM2-7, wobei alle Proteine zusammen als stabiler CMG-Komplex den DNA-Doppelstrang entwinden. Wenn MCM8 als Helikase in die DNA-Replikation der eukaryotischen Zelle involviert ist, ist eine Interaktion mit CDC45 wahrscheinlich. Daher wurde in dieser Arbeit die Interaktion von MCM8 mit dem humanen Protein CDC45 nach Co-Expression der rekombinanten Proteine in High Five-Insektenzellen untersucht.

Hinweise auf eine Interaktion von MCM8 und CDC45 ergaben sich zunächst durch eine Co-Aufreinigung der rekombinanten Proteine Strep_MCM8 und His_CDC45 mittels Talon- und

anschließender Strep-Tactin-Chromatographie, in welchen beide Proteine in beiden Aufreinigungsschritten co-eluierten.

Zur Verifizierung der Interaktion wurde eine Gelfiltration der rekombinanten Konstrukte MCM8_H10 und CDC45 durchgeführt. Auch hier co-eluierten beide Proteine miteinander, was einen weiteren Hinweis auf eine Interaktion lieferte.

Durch Immunopräzipitationsexperimente von MCM8_H10 und CDC45 aus High-Five-Zellextrakten, wo beide rekombinanten Proteine mit dem jeweiligen Interaktionspartner co-präzipitierten, konnte gezeigt werden, dass MCM8 und CDC45 *in vitro* interagieren.

Eine *in vivo*-Interaktion der beiden Proteine im humanen Zellzyklus wurde in HeLa-Zellen untersucht. Ein Hinweis auf eine *in vivo*-Interaktion von MCM8 und CDC45 ergab sich durch Immunopräzipitationen von CDC45 mit einem MCM8-Antikörper aus Zellextrakten logarithmisch wachsender HeLa-Zellen.

Die Untersuchung fraktionierter Zellextrakte synchronisierter HeLa-Zellen lieferte Informationen über den Zeitpunkt und den Ort der Interaktion von MCM8 und CDC45 im Zellzyklus. Es ist bekannt, dass die Proteine MCM2-7 aufgrund ihrer essentiellen Funktion in der initialen Entwindung der DNA zur DNA-Replikation vor allem zu Beginn der Synthese-Phase chromatingebunden vorliegen. Hier konnte gezeigt werden, dass MCM8 und CDC45 gegen Ende der Synthese-Phase und am Übergang der G2- zur Mitose-Phase verstärkt chromatingebunden vorliegen, während die Chromatinbindung von MCM2 wie erwartet zu Beginn der Synthesephase am stärksten ist. Dies lässt darauf schließen, dass das humane MCM8 wahrscheinlich eher in die Elongation als in die Initiation der eukaryotischen DNA-Replikation involviert ist. Da für MCM8 *in vitro* keine Aktivität nachgewiesen werden konnte, ist es ebenfalls denkbar, dass MCM8 eine bisher noch nicht untersuchte regulatorische Funktion besitzt. Die tatsächliche Rolle von MCM8 im eukaryotischen Zellzyklus bleibt weiterhin unklar, bedarf jedoch gerade im Hinblick auf seinen potenziellen Wert als Tumor-Marker weiterer Aufklärung.

6. Summary

MCM-Proteins play an important role in the replication of DNA in Eukarya and Archaea. A heterohexameric complex, composed of the proteins MCM2-7 is known to be the replicative helicase of eukaryotic cells that unwinds the double-stranded DNA and thus makes it accessible for replication by the DNA-Polymerases. In Archaea this action is performed by a homohexameric MCM-complex. Another member of the MCM2-7 protein family is MCM8. There is evidence that MCM8 acts as a homohexameric helicase in eukaryotic DNA replication, but the exact function of the protein is widely unknown. By examination of several tumor tissues it has been shown that human MCM8 accumulates or is mutated in a variety of tumor cells. This leads to the conclusion that in these cases MCM8 may be involved in the development of tumors. To contribute to the understanding of the development of cancer, the function of MCM8 has to be explored.

The first aim of this study was to establish a heterologous expression system to express soluble human MCM8 protein for purification. To achieve this, the prokaryotic system *Escherichia coli* and the eukaryotic systems *Saccharomyces cerevisiae* as well as Sf9 and High Five insect cells were tested. In *S. cerevisiae* no expression of MCM8 could be detected due to a probable toxic effect of the protein. In *E. coli* expression of soluble protein could be achieved by coexpression of *E. coli* trigger factor at an expression temperature of 15°C. In insect cells soluble MCM8 could be obtained via plasmid-based transient expression as well as baculovirus-mediated expression.

Soluble recombinant MCM8 was purified by affinity-, heparin- and ion-exchange-chromatography and was tested for enzymatic activity. It is known that MCM-proteins exhibit DNA-dependent ATPase-activity and that this activity can be abolished by mutation of a conserved Lysine residue inside the active site of the protein. To assign a potential ATPase-activity to MCM8, the activities of the wild-type protein as well as that of the putative ATPase-deficient mutant MCM8 K460E were analyzed. An ATPase-activity could neither be shown for MCM8 expressed in *E. coli* nor MCM8 expressed in insect cells. Also ATPase activity could not be stimulated by addition of single-stranded or double-stranded DNA. This lead to the conclusion that MCM8 alone has no enzymatic activity *in vitro*.

Presumably MCM8 needs the assistance of a co-factor to execute its function *in vivo*. CDC45 and the GINS-protein complex are regarded to be essential co-factors for the MCM2-7 helicase. These proteins together form the CMG-complex and unwind double-stranded DNA. If MCM8 acts as a helicase in eukaryotic DNA replication, it is likely that it interacts with CDC45. In this work, the interaction of MCM8 and CDC45 was explored after expression of the recombinant proteins in High Five insect cells.

Indications for the interaction of MCM8 and CDC45 were obtained by co-purification of the recombinant proteins Strep_MCM8 and His_CDC45 via Talon- and Strep-Tactin-chromatography. Here both proteins co-eluted in both purification steps.

To verify this interaction, gel filtration of the recombinant constructs MCM8_H10 and CDC45 was performed. Here both proteins co-eluted as well, which was another hint for their interaction.

In immunoprecipitation experiments of MCM8_H10 and CDC45 from High Five cell extracts both proteins co-precipitated with the respective interaction partner. Here it could be shown that MCM8 and CDC45 interact *in vitro*.

An *in vivo*-Interaction of MCM8 and CDC45 was investigated in HeLa cells. An indication of the *in vivo*-interaction of MCM8 and CDC45 was given by the immunoprecipitation of CDC45 with an anti-MCM8 antibody from cell extracts of logarithmically growing HeLa cells.

Information about the time of the interaction of MCM8 and CDC45 in the human cell cycle and localization of the proteins inside the cell was obtained by analysis of fractionated cell extracts of synchronized HeLa cells. It is known that the MCM2-7 proteins are bound to chromatin in the early Synthesis-phase due to their essential role in the initial unwinding of chromosomal DNA for replication. Here it could be shown that chromatin binding of MCM8 and CDC45 occurs mainly in the late S-Phase and at G2/M-Phase transition, whereas most chromatin binding of MCM2 was detected in the early S-phase, as expected. This leads to the conclusion, that human MCM8 might be involved in elongation and not in initiation of DNA replication. Because no *in vitro* activity could be shown for MCM8, it is also possible that MCM8 exhibits another, not yet explored regulatory function. The exact role of MCM8 in the eukaryotic cell cycle remains unclear, but with regard to its potential usefulness as a tumor marker further investigation of the MCM8 function is required.

7. Abkürzungsverzeichnis

2-ME	2-Mercaptoethanol
α -	anti-
AAA ⁺	<i>ATPases Associated With Diverse Cellular Activities</i>
Abb.	Abbildung
Ac	Acetat
AcNPV	<i>Autographa californica Nuclear Polyhedrosis Virus</i>
<i>Amp^R</i>	Ampicillin-Resistenzgen
AP	alkalische Phosphatase
APS	Ammoniumperoxydisulfat
AS	Aminosäure(n)
ATP	Adenosintriphosphat
ATPase	Adenosintriphosphatase
b	Basen (einzelsträngige DNA)
BCIP	5-Brom-4-Chlor-3-Indoxylphosphat
bp	Basenpaare (doppelsträngige DNA)
BSA	Bovines Serumalbumin
c	Konzentration
C-terminal	Carboxyterminal
cAMP	cyclisches Adenosinmonophosphat
CAP	<i>Catabolite Gene Activator Protein</i>
CDC	cell division cycle
Cdt	Cdc10-dependent target
CDK	Cyclinabhängige Kinase (<i>cyclin-dependent kinase</i>)
CMG	CDC45-MCM2-7-GINS
Da	Dalton
DDK	Dbf4-abhängige Kinase (<i>Dbf4-dependent kinase</i>)
dest.	destilliert
DGCR	<i>DiGeorge critical region</i>
DMEM	<i>Dulbecco's Modified Eagle Medium</i>
DMF	Dimethylformamid
DMSO	Dimethylsulfoxid
Dpb	DNA-Polymerase B Untereinheit (<i>DNA polymerase B subunit</i>)
dATP (A)	Desoxyadenosintriphosphat
dCTP (C)	Desoxycytidintriphosphat
dGTP (G)	Desoxyguanosintriphosphat
dTTP (T)	Desoxythymidintriphosphat
DC	Dünnschichtchromatographie
DEAE	Diethylaminoethyl
DNA	Desoxyribonukleinsäure

DNAse	Desoxyribonuklease
dNTPs	äquimolares Gemisch von dATP, dCTP, dGTP und dTTP
dsDNA	doppelsträngige Desoxyribonukleinsäure
DTT	1,4-Dithiothreitol
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
ECL	<i>enhanced chemiluminescence</i>
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
eGFP	<i>enhanced green fluorescent protein</i>
EMD	Emanuel Merck Darmstadt
FACS	<i>Fluorescence activated cell sorting</i>
FCS	Fötales Kälberserum (Zellkultur); <i>Forward Scatter</i> (Durchflusszytometrie)
FPLC	<i>Fast Protein Liquid Chromatography</i>
g	bei Zentrifugation: Schwerebeschleunigung der Erde
G1 bzw. G2-Phase	<i>Gap 1</i> – bzw. <i>Gap 2</i> – Phase
Gal	Galaktose
GINS	Go, Ichi, Nii, und San
Glu	Glukose
gus	Glucuronidase
H6 bzw. H10	6fach bzw. 10fach Histidin
HEPES	N-(2-Hydroxyethyl)piperazin-N'-(2-ethansulfonsäure)
HeLa	humane Tumorzelllinie von Henrietta Lacks
His-Tag	Histidin-Tag
<i>HiV</i>	<i>High Five</i> Insektenzellen
HRP	Meerrettichperoxidase (<i>Horseradish peroxidase</i>)
HT	Horvath
IC	Initiationskomplex (<i>initiation complex</i>)
IgG	Immunglobulin G
IP	Immunopräzipitation
IPTG	Isopropyl- β -thiogalactopyranosid
kb	Kilobasenpaare
<i>Kan^R</i>	Kanamycin-Resistenzgen
<i>lacI</i>	Gen des Lac Repressors
LB	Luria Bertani (Medium)
M-Phase	Mitose-Phase
MACS	<i>magnetic activated cell sorting</i>
MCM	<i>Mini Chromosome Maintenance</i>
MEK-2	MAP/ERK-Kinase
<i>mis</i>	<i>mutants that display high loss rates of minichromosomes at permissive or semipermissive temperature</i>
<i>Mth</i>	<i>Methanothermobacter thermautotrophicus</i>
MOPS	4-Morpholinopropansulfonsäure

mRNA	<i>messenger</i> Ribonukleinsäure
MWCO	<i>Molecular Weight Cut Off</i>
N-terminal	Aminoterminal
NBT	Nitroblau-Tetrazoliumchlorid
NDSB	nicht-detergentes Sulfobetain
Ni-IDA	Nickel-Iminodiessigsäure
Ni-NTA	Nickel-Nitriloessigsäure
Ni-TED	Nickel-Tris-Carboxymethyl-Ethyldiamin
NLS	Nukleäres Lokalisationssignal
OD_{xxx}	optische Dichte bei $\lambda = xxx \text{ nm}$
ORC, Orc	<i>Origin Recognition Complex</i>
ORF	<i>open reading frame</i>
Ori, origin	Replikationsursprung (<i>origin of replication</i>)
<i>P-loop</i>	<i>phosphate binding loop</i>
p.a.	<i>pro analysis</i>
PAA	Polyacrylamid
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PBS	phosphatgepufferte Kochsalzlösung
PCNA	<i>Proliferating Cell Nuclear Antigen</i>
PCR	Polymerasekettenreaktion (<i>Polymerase Chain Reaction</i>)
PEG	Polyethylenglycol
<i>Pfu</i>	<i>Pyrococcus furiosus</i>
pH	potentia Hydrogenii
P_i	freies Phosphat
PI	Propidiumjodid
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
Pol	Polymerase
pre-RC	präreplikativer Komplex (<i>pre-replicative complex</i>)
psf	<i>partner of Sld5</i>
PVDF	Polyvinylidenfluorid
Q-Sepharose	<i>quaternary ammonium sepharose</i>
REC	<i>recombination defective</i>
ReQL4	<i>RecQ protein like 4</i>
RFC	Replikationsfaktor C
RNA	Ribonukleinsäure
RNase	Ribonuklease
RT	Raumtemperatur
RPA	Replikationsprotein A
S-CDK	Synthese-Phase-spezifische cyclinabhängige Kinase
S-Phase	Synthese-Phase
S-Sepharose	Methyl-Sulfonat-Sepharose

<i>S. cerevisiae</i>	Bäckerhefe: <i>Saccharomyces cerevisiae</i>
SBED	Sorbitol-Bicin-Ethylenglycol-DMSO
SD	Selektives Minimalmedium
SDS	Natriumdodecylsulfat
SF	Superfamilie
SFM	serumfreies Medium
<i>Sf9</i>	<i>Spodoptera frugiperda</i> 9 Insektenzellen
Sld	<i>synthetically lethal with Dpb11-1</i>
Ssc	<i>Sideward scatter</i>
ssDNA	einzelsträngige Desoxyribonukleinsäure
Sso	<i>Sulfolobus solfataricus</i>
Strep-Tag	Streptavidin-Tag
T4-Ligase	Ligase des Bakteriophagen T4
Tab.	Tabelle
TAE	Tris/Acetat/EDTA
<i>Taq</i>	<i>Thermus aquaticus</i>
TBE	Tris/Borat/EDTA
TC	<i>tissue culture</i>
TdR	Thymidindesoxyribose
TE	Tris-EDTA
TF	Trigger Faktor
TEMED	N, N, N., N.-Tetramethylethylendiamin
TICRR	<i>TopBP1-interacting, checkpoint, and replication regulator</i>
TMAE	Trimethylaminoethyl
TopBP1	<i>DNA topoisomerase II binding protein</i>
Tricin	N-(Tris(hydroxymethyl)-methyl)glycin
Tris	Tris(hydroxymethyl)aminomethan
tRNA	<i>transporter</i> Ribonukleinsäure
U	Einheit der enzymatischen Aktivität (<i>Unit</i>)
ün	über Nacht
ÜNK bzw. ÜTK	Über-Nacht-Kultur bzw. Über-Tag-Kultur
UV	Ultraviolettstrahlung
VE	voll entsalzt
VIS-Spektroskopie	Spektroskopie mit sichtbarem (<i>visible</i>) Licht
vol.	Volumen
w/v	Gewicht/Volumen
WT	Wildtyp (Protein mit unveränderter Aminosäuresequenz)
X-Gluc	5-Brom-4-Chlor-3-Indolyl- β -D-Glucuronsäure
<i>Xl</i>	<i>Xenopus laevis</i>
YNB	<i>Yeast nitrogen base</i>
YP	<i>Yeast-Peptone-Medium</i>

Aminosäuren

A	Alanin
R	Arginin
N	Asparagin
D	Asparaginsäure
C	Cystein
Q	Glutamin
E	Glutaminsäure
G	Glycin
H	Histidin
I	Isoleucin
L	Leucin
K	Lysin
M	Methionin
F	Phenylalanin
P	Prolin
S	Serin
T	Threonin
W	Tryptophan
Y	Tyrosin
V	Valin
X	jede beliebige Aminosäure
h	hydrophobe Aminosäure

Einheiten

A	Ampere
°C	Grad Celsius
cal	Kalorie
Ci	Curie
g	Gramm
h	Stunde
l	Liter
K	Grad Kelvin
m	Meter
M	Molar (mol/l)
min	Minute(n)
sec	Sekunde(n)
rpm	Umdrehungen pro Minute (<i>rounds per minute</i>)
U	Unit (Einheit)
V	Volt
W	Watt

Nukleotide

A	Adenin
C	Cytosin
G	Guanin
T	Thymin
U	Uracil
N	A, C, G, T

Vorsätze

k	kilo 10^3
m	milli 10^{-3}
μ	mikro 10^{-6}
n	nano 10^{-9}
p	pico 10^{-12}

8. Literaturverzeichnis

- Adachi Y, Usukura J, Yanagida M (1997) A globular complex formation by Nda1 and the other five members of the MCM protein family in fission yeast. *Genes Cells* **2**: 467-479
- Agarkar VB, Babayeva ND, Pavlov YI, Tahirov TH (2011) Crystal structure of the C-terminal domain of human DNA primase large subunit: Implications for the mechanism of the primase - polymerase alpha switch. *Cell Cycle* **10**
- Agashe VR, Guha S, Chang HC, Genevaux P, Hayer-Hartl M, Stemp M, Georgopoulos C, Hartl FU, Barral JM (2004) Function of trigger factor and DnaK in multidomain protein folding: increase in yield at the expense of folding speed. *Cell* **117**: 199-209
- Aparicio OM, Weinstein DM, Bell SP (1997) Components and dynamics of DNA replication complexes in *S. cerevisiae*: redistribution of MCM proteins and Cdc45p during S phase. *Cell* **91**: 59-69
- Aparicio T, Guillou E, Coloma J, Montoya G, Mendez J (2009) The human GINS complex associates with Cdc45 and MCM and is essential for DNA replication. *Nucleic Acids Res* **37**: 2087-2095
- Aparicio T, Ibarra A, Mendez J (2006) Cdc45-MCM-GINS, a new power player for DNA replication. *Cell Div* **1**: 18
- Atkinson J, Gupta MK, McGlynn P (2011) Interaction of Rep and DnaB on DNA. *Nucleic Acids Res* **39**: 1351-1359
- Barry ER, McGeoch AT, Kelman Z, Bell SD (2007) Archaeal MCM has separable processivity, substrate choice and helicase domains. *Nucleic Acids Res* **35**: 988-998
- Bauerschmidt C, Pollok S, Kremmer E, Nasheuer HP, Grosse F (2007) Interactions of human Cdc45 with the Mcm2-7 complex, the GINS complex, and DNA polymerases delta and epsilon during S phase. *Genes Cells* **12**: 745-758
- Bell SP, Dutta A (2002) DNA replication in eukaryotic cells. *Annu Rev Biochem* **71**: 333-374
- Bell SP, Stillman B (1992) ATP-dependent recognition of eukaryotic origins of DNA replication by a multiprotein complex. *Nature* **357**: 128-134
- Biswas-Fiss EE, Khopde SM, Biswas SB (2005) The Mcm467 complex of *Saccharomyces cerevisiae* is preferentially activated by autonomously replicating DNA sequences. *Biochemistry* **44**: 2916-2925
- Bjursell G, Reichard P (1973) Effects of thymidine on deoxyribonucleoside triphosphate pools and deoxyribonucleic acid synthesis in Chinese hamster ovary cells. *J Biol Chem* **248**: 3904-3909
- Blanton HL, Radford SJ, McMahan S, Kearney HM, Ibrahim JG, Sekelsky J (2005) REC, *Drosophila* MCM8, drives formation of meiotic crossovers. *PLoS Genet* **1**: e40
- Blow JJ, Dutta A (2005) Preventing re-replication of chromosomal DNA. *Nat Rev Mol Cell Biol* **6**: 476-486
- Bochman ML, Bell SP, Schwacha A (2008) Subunit organization of Mcm2-7 and the unequal role of active sites in ATP hydrolysis and viability. *Mol Cell Biol* **28**: 5865-5873
- Bochman ML, Schwacha A (2007) Differences in the single-stranded DNA binding activities of MCM2-7 and MCM467: MCM2 and MCM5 define a slow ATP-dependent step. *J Biol Chem* **282**: 33795-33804
- Bochman ML, Schwacha A (2008) The Mcm2-7 complex has in vitro helicase activity. *Mol Cell* **31**: 287-293

- Bochman ML, Schwacha A (2009) The Mcm complex: unwinding the mechanism of a replicative helicase. *Microbiol Mol Biol Rev* **73**: 652-683
- Bootsma D, Budke L, Vos O (1964) Studies on Synchronous Division of Tissue Culture Cells Initiated by Excess Thymidine. *Exp Cell Res* **33**: 301-309
- Boskovic J, Coloma J, Aparicio T, Zhou M, Robinson CV, Mendez J, Montoya G (2007) Molecular architecture of the human GINS complex. *EMBO Rep* **8**: 678-684
- Bostock CJ, Prescott DM, Kirkpatrick JB (1971) An evaluation of the double thymidine block for synchronizing mammalian cells at the G1-S border. *Exp Cell Res* **68**: 163-168
- Bradford MM (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* **72**: 248-254
- Brewster AS, Slaymaker IM, Afif SA, Chen XS (2010) Mutational analysis of an archaeal minichromosome maintenance protein exterior hairpin reveals critical residues for helicase activity and DNA binding. *BMC Mol Biol* **11**: 62
- Brewster AS, Wang G, Yu X, Greenleaf WB, Carazo JM, Tjajadia M, Klein MG, Chen XS (2008) Crystal structure of a near-full-length archaeal MCM: functional insights for an AAA+ hexameric helicase. *Proc Natl Acad Sci U S A* **105**: 20191-20196
- Buckholz RG, Gleeson MA (1991) Yeast systems for the commercial production of heterologous proteins. *Biotechnology (N Y)* **9**: 1067-1072
- Bujalowski W, Klonowska MM (1993) Negative cooperativity in the binding of nucleotides to Escherichia coli replicative helicase DnaB protein. Interactions with fluorescent nucleotide analogs. *Biochemistry* **32**: 5888-5900
- Bukau B, Deuerling E, Pfund C, Craig EA (2000) Getting newly synthesized proteins into shape. *Cell* **101**: 119-122
- Bukau B, Weissman J, Horwich A (2006) Molecular chaperones and protein quality control. *Cell* **125**: 443-451
- Burgers PM (2009) Polymerase dynamics at the eukaryotic DNA replication fork. *J Biol Chem* **284**: 4041-4045
- Carpentieri F, De Felice M, De Falco M, Rossi M, Pisani FM (2002) Physical and functional interaction between the mini-chromosome maintenance-like DNA helicase and the single-stranded DNA binding protein from the crenarchaeon Sulfolobus solfataricus. *J Biol Chem* **277**: 12118-12127
- Chong JP, Hayashi MK, Simon MN, Xu RM, Stillman B (2000) A double-hexamer archaeal minichromosome maintenance protein is an ATP-dependent DNA helicase. *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**: 1530-1535
- Christensen TW, Tye BK (2003) Drosophila MCM10 interacts with members of the prereplication complex and is required for proper chromosome condensation. *Mol Biol Cell* **14**: 2206-2215
- Clarey MG, Erzberger JP, Grob P, Leschziner AE, Berger JM, Nogales E, Botchan M (2006) Nucleotide-dependent conformational changes in the DnaA-like core of the origin recognition complex. *Nat Struct Mol Biol* **13**: 684-690
- Costa A, Ilves I, Tamberg N, Petojevic T, Nogales E, Botchan MR, Berger JM (2011) The structural basis for MCM2-7 helicase activation by GINS and Cdc45. *Nat Struct Mol Biol* **18**: 471-477
- Crevel G, Hashimoto R, Vass S, Sherkow J, Yamaguchi M, Heck MM, Cotterill S (2007) Differential requirements for MCM proteins in DNA replication in Drosophila S2 cells. *PLoS One* **2**: e833

- DaFonseca CJ, Shu F, Zhang JJ (2001) Identification of two residues in MCM5 critical for the assembly of MCM complexes and Stat1-mediated transcription activation in response to IFN-gamma. *Proc Natl Acad Sci U S A* **98**: 3034-3039
- Dai Y, Gold B, Vishwanatha JK, Rhode SL (1994) Mimosine inhibits viral DNA synthesis through ribonucleotide reductase. *Virology* **205**: 210-216
- Davey MJ, Indiani C, O'Donnell M (2003) Reconstitution of the Mcm2-7p heterohexamer, subunit arrangement, and ATP site architecture. *J Biol Chem* **278**: 4491-4499
- Davis TR, Trotter KM, Granados RR, Wood HA (1992) Baculovirus expression of alkaline phosphatase as a reporter gene for evaluation of production, glycosylation and secretion. *Biotechnology (N Y)* **10**: 1148-1150
- Delmolino LM, Saha P, Dutta A (2001) Multiple mechanisms regulate subcellular localization of human CDC6. *J Biol Chem* **276**: 26947-26954
- Deuerling E, Schulze-Specking A, Tomoyasu T, Mogk A, Bukau B (1999) Trigger factor and DnaK cooperate in folding of newly synthesized proteins. *Nature* **400**: 693-696
- Diffley JF (2004) Regulation of early events in chromosome replication. *Curr Biol* **14**: R778-786
- Dohmen RJ, Strasser AW, Honer CB, Hollenberg CP (1991) An efficient transformation procedure enabling long-term storage of competent cells of various yeast genera. *Yeast* **7**: 691-692
- Donaldson JR, Courcelle CT, Courcelle J (2006) RuvABC is required to resolve holliday junctions that accumulate following replication on damaged templates in Escherichia coli. *J Biol Chem* **281**: 28811-28821
- Dong Z, Zhang JT (2003) EIF3 p170, a mediator of mimosine effect on protein synthesis and cell cycle progression. *Mol Biol Cell* **14**: 3942-3951
- Donmez I, Patel SS (2006) Mechanisms of a ring shaped helicase. *Nucleic Acids Res* **34**: 4216-4224
- Drury LS, Perkins G, Diffley JF (1997) The Cdc4/34/53 pathway targets Cdc6p for proteolysis in budding yeast. *EMBO J* **16**: 5966-5976
- Erzberger JP, Berger JM (2006) Evolutionary relationships and structural mechanisms of AAA+ proteins. *Annu Rev Biophys Biomol Struct* **35**: 93-114
- Evrin C, Clarke P, Zech J, Lurz R, Sun J, Uhle S, Li H, Stillman B, Speck C (2009) A double-hexameric MCM2-7 complex is loaded onto origin DNA during licensing of eukaryotic DNA replication. *Proc Natl Acad Sci U S A* **106**: 20240-20245
- Felgner PL, Gadek TR, Holm M, Roman R, Chan HW, Wenz M, Northrop JP, Ringold GM, Danielsen M (1987) Lipofection: a highly efficient, lipid-mediated DNA-transfection procedure. *Proc Natl Acad Sci U S A* **84**: 7413-7417
- Fletcher RJ, Bishop BE, Leon RP, Sclafani RA, Ogata CM, Chen XS (2003) The structure and function of MCM from archaeal M. Thermoautotrophicum. *Nat Struct Biol* **10**: 160-167
- Fletcher RJ, Chen XS (2006) Biochemical activities of the BOB1 mutant in Methanobacterium thermoautotrophicum MCM. *Biochemistry* **45**: 462-467
- Fletcher RJ, Shen J, Gomez-Llorente Y, Martin CS, Carazo JM, Chen XS (2005) Double hexamer disruption and biochemical activities of Methanobacterium thermoautotrophicum MCM. *J Biol Chem* **280**: 42405-42410
- Freeman A, Morris LS, Mills AD, Stoeber K, Laskey RA, Williams GH, Coleman N (1999) Minichromosome maintenance proteins as biological markers of dysplasia and malignancy. *Clin Cancer Res* **5**: 2121-2132

- Frick DN, Richardson CC (2001) DNA primases. *Annu Rev Biochem* **70**: 39-80
- Frydman J (2001) Folding of newly translated proteins in vivo: the role of molecular chaperones. *Annu Rev Biochem* **70**: 603-647
- Fukui T, Yamauchi K, Muroya T, Akiyama M, Maki H, Sugino A, Waga S (2004) Distinct roles of DNA polymerases delta and epsilon at the replication fork in *Xenopus* egg extracts. *Genes Cells* **9**: 179-191
- Gai D, Zhao R, Li D, Finkelstein CV, Chen XS (2004) Mechanisms of conformational change for a replicative hexameric helicase of SV40 large tumor antigen. *Cell* **119**: 47-60
- Gambus A, Jones RC, Sanchez-Diaz A, Kanemaki M, van Deursen F, Edmondson RD, Labib K (2006) GINS maintains association of Cdc45 with MCM in replisome progression complexes at eukaryotic DNA replication forks. *Nat Cell Biol* **8**: 358-366
- Gambus A, Khoudoli GA, Jones RC, Blow JJ (2011) MCM2-7 Form Double Hexamers at Licensed Origins in *Xenopus* Egg Extract. *J Biol Chem* **286**: 11855-11864
- Garg P, Burgers PM (2005) DNA polymerases that propagate the eukaryotic DNA replication fork. *Crit Rev Biochem Mol Biol* **40**: 115-128
- Gaur RK (2007) Helicase: mystery of progression. *Mol Biol Rep* **34**: 161-164
- Gavin KA, Hidaka M, Stillman B (1995) Conserved initiator proteins in eukaryotes. *Science* **270**: 1667-1671
- Goldberg AL, Swamy KH, Chung CH, Larimore FS (1981) Proteases in *Escherichia coli*. *Methods Enzymol* **80 Pt C**: 680-702
- Gorbalenya AE, Koonin, E.V. (1993) Helicases: amino acid sequence comparison and structure-function-relationships. *Curr Opin Struct Biol* **3**: 419-429
- Gossen M, Pak DT, Hansen SK, Acharya JK, Botchan MR (1995) A *Drosophila* homolog of the yeast origin recognition complex. *Science* **270**: 1674-1677
- Gottesman S (1996) Proteases and their targets in *Escherichia coli*. *Annu Rev Genet* **30**: 465-506
- Gozuacik D, Chami M, Lagorce D, Faivre J, Murakami Y, Poch O, Biermann E, Knippers R, Brechot C, Paterlini-Brechot P (2003) Identification and functional characterization of a new member of the human Mcm protein family: hMcm8. *Nucleic Acids Res* **31**: 570-579
- Graham FL, van der Eb AJ (1973) A new technique for the assay of infectivity of human adenovirus 5 DNA. *Virology* **52**: 456-467
- Grivell LA, Planta RJ (1990) Yeast: the model 'eukaryote'? *Trends Biotechnol* **8**: 241-243
- Grossman TH, Kawasaki ES, Punreddy SR, Osburne MS (1998) Spontaneous cAMP-dependent derepression of gene expression in stationary phase plays a role in recombinant expression instability. *Gene* **209**: 95-103
- Gupta MK, Atkinson J, McGlynn P (2010) DNA structure specificity conferred on a replicative helicase by its loader. *J Biol Chem* **285**: 979-987
- Hanahan D (1983) Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *J Mol Biol* **166**: 557-580
- Hanson PI, Whiteheart SW (2005) AAA+ proteins: have engine, will work. *Nat Rev Mol Cell Biol* **6**: 519-529
- Hardy CF (1997) Identification of Cdc45p, an essential factor required for DNA replication. *Gene* **187**: 239-246

- Hartl FU, Hayer-Hartl M (2002) Molecular chaperones in the cytosol: from nascent chain to folded protein. *Science* **295**: 1852-1858
- Hennessy KM, Lee A, Chen E, Botstein D (1991) A group of interacting yeast DNA replication genes. *Genes Dev* **5**: 958-969
- Hesterkamp T, Bukau B (1996) The Escherichia coli trigger factor. *FEBS Lett* **389**: 32-34
- Homesley L, Lei M, Kawasaki Y, Sawyer S, Christensen T, Tye BK (2000) Mcm10 and the MCM2-7 complex interact to initiate DNA synthesis and to release replication factors from origins. *Genes Dev* **14**: 913-926
- Hopwood B, Dalton S (1996) Cdc45p assembles into a complex with Cdc46p/Mcm5p, is required for minichromosome maintenance, and is essential for chromosomal DNA replication. *Proc Natl Acad Sci U S A* **93**: 12309-12314
- Horvath A, Riezman H (1994) Rapid protein extraction from *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast* **10**: 1305-1310
- Hubscher U, Maga G, Spadari S (2002) Eukaryotic DNA polymerases. *Annu Rev Biochem* **71**: 133-163
- Hughes TA, Cook PR (1996) Mimosine arrests the cell cycle after cells enter S-phase. *Exp Cell Res* **222**: 275-280
- Ilves I, Petojevic T, Pesavento JJ, Botchan MR (2010) Activation of the MCM2-7 helicase by association with Cdc45 and GINS proteins. *Mol Cell* **37**: 247-258
- Ishimi Y (1997) A DNA helicase activity is associated with an MCM4, -6, and -7 protein complex. *J Biol Chem* **272**: 24508-24513
- Ishimi Y, Komamura-Kohno Y, Arai K, Masai H (2001) Biochemical activities associated with mouse Mcm2 protein. *J Biol Chem* **276**: 42744-42752
- Iyer LM, Leippe DD, Koonin EV, Aravind L (2004) Evolutionary history and higher order classification of AAA+ ATPases. *J Struct Biol* **146**: 11-31
- Jenkinson ER, Chong JP (2006) Minichromosome maintenance helicase activity is controlled by N- and C-terminal motifs and requires the ATPase domain helix-2 insert. *Proc Natl Acad Sci U S A* **103**: 7613-7618
- Johnson EM, Kinoshita Y, Daniel DC (2003) A new member of the MCM protein family encoded by the human MCM8 gene, located contrapodal to GCD10 at chromosome band 20p12.3-13. *Nucleic Acids Res* **31**: 2915-2925
- Kalejta RF, Hamlin JL (1997) The dual effect of mimosine on DNA replication. *Exp Cell Res* **231**: 173-183
- Kamimura Y, Tak YS, Sugino A, Araki H (2001) Sld3, which interacts with Cdc45 (Sld4), functions for chromosomal DNA replication in *Saccharomyces cerevisiae*. *EMBO J* **20**: 2097-2107
- Kanter DM, Bruck I, Kaplan DL (2008) Mcm subunits can assemble into two different active unwinding complexes. *J Biol Chem* **283**: 31172-31182
- Kaplan DL (2000) The 3'-tail of a forked-duplex sterically determines whether one or two DNA strands pass through the central channel of a replication-fork helicase. *J Mol Biol* **301**: 285-299
- Kaplan DL, Davey MJ, O'Donnell M (2003) Mcm4,6,7 uses a "pump in ring" mechanism to unwind DNA by steric exclusion and actively translocate along a duplex. *J Biol Chem* **278**: 49171-49182

- Kasiviswanathan R, Shin JH, Melamud E, Kelman Z (2004) Biochemical characterization of the *Methanothermobacter thermoautotrophicus* minichromosome maintenance (MCM) helicase N-terminal domains. *J Biol Chem* **279**: 28358-28366
- Kawasaki Y, Hiraga S, Sugino A (2000) Interactions between Mcm10p and other replication factors are required for proper initiation and elongation of chromosomal DNA replication in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genes Cells* **5**: 975-989
- Kearsey SE, Labib K (1998) MCM proteins: evolution, properties, and role in DNA replication. *Biochim Biophys Acta* **1398**: 113-136
- Kelman Z, Lee JK, Hurwitz J (1999) The single minichromosome maintenance protein of *Methanobacterium thermoautotrophicum* DeltaH contains DNA helicase activity. *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**: 14783-14788
- Kim JL, Morgenstern KA, Griffith JP, Dwyer MD, Thomson JA, Murcko MA, Lin C, Caron PR (1998) Hepatitis C virus NS3 RNA helicase domain with a bound oligonucleotide: the crystal structure provides insights into the mode of unwinding. *Structure* **6**: 89-100
- Kinoshita Y, Johnson EM, Gordon RE, Negri-Bell H, Evans MT, Coolbaugh J, Rosario-Peralta Y, Samet J, Slusser E, Birkenbach MP, Daniel DC (2008) Colocalization of MCM8 and MCM7 with proteins involved in distinct aspects of DNA replication. *Microsc Res Tech* **71**: 288-297
- Knoll A, Puchta H (2011) The role of DNA helicases and their interaction partners in genome stability and meiotic recombination in plants. *J Exp Bot* **62**: 1565-1579
- Koonin EV (1993) A common set of conserved motifs in a vast variety of putative nucleic acid-dependent ATPases including MCM proteins involved in the initiation of eukaryotic DNA replication. *Nucleic Acids Res* **21**: 2541-2547
- Kopetzki E, Schumacher G, Buckel P (1989) Control of formation of active soluble or inactive insoluble baker's yeast alpha-glucosidase PI in *Escherichia coli* by induction and growth conditions. *Mol Gen Genet* **216**: 149-155
- Koppen A, Ait-Aissa R, Koster J, van Sluis PG, Ora I, Caron HN, Volckmann R, Versteeg R, Valentijn LJ (2007) Direct regulation of the minichromosome maintenance complex by MYCN in neuroblastoma. *Eur J Cancer* **43**: 2413-2422
- Kramer G, Rauch T, Rist W, Vorderwulbecke S, Patzelt H, Schulze-Specking A, Ban N, Deuerling E, Bukau B (2002) L23 protein functions as a chaperone docking site on the ribosome. *Nature* **419**: 171-174
- Krammer F, Schinko T, Palmberger D, Tauer C, Messner P, Grabherr R (2010) *Trichoplusia ni* cells (*High Five*) are highly efficient for the production of influenza A virus-like particles: a comparison of two insect cell lines as production platforms for influenza vaccines. *Mol Biotechnol* **45**: 226-234
- Kreitz S, Ritzi M, Baack M, Knippers R (2001) The human origin recognition complex protein 1 dissociates from chromatin during S phase in HeLa cells. *J Biol Chem* **276**: 6337-6342
- Krude T (1999) Mimosine arrests proliferating human cells before onset of DNA replication in a dose-dependent manner. *Exp Cell Res* **247**: 148-159
- Kubota Y, Takase Y, Komori Y, Hashimoto Y, Arata T, Kamimura Y, Araki H, Takisawa H (2003) A novel ring-like complex of *Xenopus* proteins essential for the initiation of DNA replication. *Genes Dev* **17**: 1141-1152
- Kukimoto I, Igaki H, Kanda T (1999) Human CDC45 protein binds to minichromosome maintenance 7 protein and the p70 subunit of DNA polymerase alpha. *Eur J Biochem* **265**: 936-943
- Labib K (2010) How do Cdc7 and cyclin-dependent kinases trigger the initiation of chromosome replication in eukaryotic cells? *Genes Dev* **24**: 1208-1219

- Laemmli UK (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**: 680-685
- Lalande M (1990) A reversible arrest point in the late G1 phase of the mammalian cell cycle. *Exp Cell Res* **186**: 332-339
- Langer T, Lu C, Echols H, Flanagan J, Hayer MK, Hartl FU (1992) Successive action of DnaK, DnaJ and GroEL along the pathway of chaperone-mediated protein folding. *Nature* **356**: 683-689
- LeBowitz JH, McMacken R (1986) The Escherichia coli dnaB replication protein is a DNA helicase. *J Biol Chem* **261**: 4738-4748
- Lee JK, Hurwitz J (2000) Isolation and characterization of various complexes of the minichromosome maintenance proteins of Schizosaccharomyces pombe. *J Biol Chem* **275**: 18871-18878
- Lee JK, Hurwitz J (2001) Processive DNA helicase activity of the minichromosome maintenance proteins 4, 6, and 7 complex requires forked DNA structures. *Proc Natl Acad Sci U S A* **98**: 54-59
- Lee JK, Seo YS, Hurwitz J (2003) The Cdc23 (Mcm10) protein is required for the phosphorylation of minichromosome maintenance complex by the Dfp1-Hsk1 kinase. *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**: 2334-2339
- Lei M, Tye BK (2001) Initiating DNA synthesis: from recruiting to activating the MCM complex. *J Cell Sci* **114**: 1447-1454
- Li Y, Gao X, Chen L (2009) GroEL Recognizes an Amphipathic Helix and Binds to the Hydrophobic Side. *J Biol Chem* **284**: 4324-4331
- Li Y, Zheng Z, Ramsey A, Chen L (2010) Analysis of peptides and proteins in their binding to GroEL. *J Pept Sci* **16**: 693-700
- Liang C, Weinreich M, Stillman B (1995) ORC and Cdc6p interact and determine the frequency of initiation of DNA replication in the genome. *Cell* **81**: 667-676
- Lin HB, Falchetto R, Mosca PJ, Shabanowitz J, Hunt DF, Hamlin JL (1996) Mimosine targets serine hydroxymethyltransferase. *J Biol Chem* **271**: 2548-2556
- Liu J, Smith CL, DeRyckere D, DeAngelis K, Martin GS, Berger JM (2000) Structure and function of Cdc6/Cdc18: implications for origin recognition and checkpoint control. *Mol Cell* **6**: 637-648
- Liu W, Pucci B, Rossi M, Pisani FM, Ladenstein R (2008) Structural analysis of the Sulfolobus solfataricus MCM protein N-terminal domain. *Nucleic Acids Res* **36**: 3235-3243
- Liu YD, Li JJ, Wang FW, Chen J, Li P, Su ZG (2007) A newly proposed mechanism for arginine-assisted protein refolding--not inhibiting soluble oligomers although promoting a correct structure. *Protein Expr Purif* **51**: 235-242
- Lodish H, Berk, A., Kaiser, C.A., Krieger, M., Scott, M.P., Bretscher, A. (2007) *Molecular Cell Biology*, Vol. 6: Palgrave Macmillan.
- Lutzmann M, Mechali M (2008) MCM9 binds Cdt1 and is required for the assembly of prereplication complexes. *Mol Cell* **31**: 190-200
- Ma X, Stead BE, Rezvanpour A, Davey MJ (2010) The effects of oligomerization on Saccharomyces cerevisiae Mcm4/6/7 function. *BMC Biochem* **11**: 37
- Maine GT, Sinha P, Tye BK (1984) Mutants of S. cerevisiae defective in the maintenance of minichromosomes. *Genetics* **106**: 365-385

- Maiorano D, Cuvier O, Danis E, Mechali M (2005) MCM8 is an MCM2-7-related protein that functions as a DNA helicase during replication elongation and not initiation. *Cell* **120**: 315-328
- Maiorano D, Lutzmann M, Mechali M (2006) MCM proteins and DNA replication. *Curr Opin Cell Biol* **18**: 130-136
- Maiorano D, Moreau J, Mechali M (2000) XCDT1 is required for the assembly of pre-replicative complexes in *Xenopus laevis*. *Nature* **404**: 622-625
- Masai H, Taniyama C, Ogino K, Matsui E, Kakusho N, Matsumoto S, Kim JM, Ishii A, Tanaka T, Kobayashi T, Tamai K, Ohtani K, Arai K (2006) Phosphorylation of MCM4 by Cdc7 kinase facilitates its interaction with Cdc45 on the chromatin. *J Biol Chem* **281**: 39249-39261
- Masuda T, Mimura S, Takisawa H (2003) CDK- and Cdc45-dependent priming of the MCM complex on chromatin during S-phase in *Xenopus* egg extracts: possible activation of MCM helicase by association with Cdc45. *Genes Cells* **8**: 145-161
- Matsubayashi H, Yamamoto MT (2003) REC, a new member of the MCM-related protein family, is required for meiotic recombination in *Drosophila*. *Genes Genet Syst* **78**: 363-371
- Matsuno K, Kumano M, Kubota Y, Hashimoto Y, Takisawa H (2006) The N-terminal noncatalytic region of *Xenopus* RecQ4 is required for chromatin binding of DNA polymerase alpha in the initiation of DNA replication. *Mol Cell Biol* **26**: 4843-4852
- Maurizi MR (1992) Proteases and protein degradation in *Escherichia coli*. *Experientia* **48**: 178-201
- McGeoch AT, Trakselis MA, Laskey RA, Bell SD (2005) Organization of the archaeal MCM complex on DNA and implications for the helicase mechanism. *Nat Struct Mol Biol* **12**: 756-762
- McKie JM, Wadey RB, Sutherland HF, Taylor CL, Scambler PJ (1998) Direct selection of conserved cDNAs from the DiGeorge critical region: isolation of a novel CDC45-like gene. *Genome Res* **8**: 834-841
- Merchant AM, Kawasaki Y, Chen Y, Lei M, Tye BK (1997) A lesion in the DNA replication initiation factor Mcm10 induces pausing of elongation forks through chromosomal replication origins in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Cell Biol* **17**: 3261-3271
- Mimura S, Masuda T, Matsui T, Takisawa H (2000) Central role for cdc45 in establishing an initiation complex of DNA replication in *Xenopus* egg extracts. *Genes Cells* **5**: 439-452
- Mogk AM, MP. Deuerling, E. (2001) Mechanismen der Proteinfaltung – Molekulare Chaperone und ihr biotechnologisches Potential. *Biologie unserer Zeit* **31**: 182-192
- Moir D, Stewart SE, Osmond BC, Botstein D (1982) Cold-sensitive cell-division-cycle mutants of yeast: isolation, properties, and pseudoreversion studies. *Genetics* **100**: 547-563
- Montagnoli A, Valsasina B, Brotherton D, Troiani S, Rainoldi S, Tenca P, Molinari A, Santocanale C (2006) Identification of Mcm2 phosphorylation sites by S-phase-regulating kinases. *J Biol Chem* **281**: 10281-10290
- Morais VA, Serpa J, Palma AS, Costa T, Maranga L, Costa J (2001) Expression and characterization of recombinant human alpha-3/4-fucosyltransferase III from *Spodoptera frugiperda* (Sf9) and *Trichoplusia ni* (Tn) cells using the baculovirus expression system. *Biochem J* **353**: 719-725
- Moreau MJ, McGeoch AT, Lowe AR, Itzhaki LS, Bell SD (2007) ATPase site architecture and helicase mechanism of an archaeal MCM. *Mol Cell* **28**: 304-314
- Morrison A, Sugino A (1994) The 3'-->5' exonucleases of both DNA polymerases delta and epsilon participate in correcting errors of DNA replication in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Gen Genet* **242**: 289-296

- Mossi R, Keller RC, Ferrari E, Hubscher U (2000) DNA polymerase switching: II. Replication factor C abrogates primer synthesis by DNA polymerase alpha at a critical length. *J Mol Biol* **295**: 803-814
- Moyer SE, Lewis PW, Botchan MR (2006) Isolation of the Cdc45/Mcm2-7/GINS (CMG) complex, a candidate for the eukaryotic DNA replication fork helicase. *Proc Natl Acad Sci U S A* **103**: 10236-10241
- Mühlhardt C (2009) *Der Experimentator - Molekularbiologie/Genomics*, Vol. 6: Spektrum Akademischer Verlag.
- Nasheuer HP, Smith R, Bauerschmidt C, Grosse F, Weisshart K (2002) Initiation of eukaryotic DNA replication: regulation and mechanisms. *Prog Nucleic Acid Res Mol Biol* **72**: 41-94
- Nishitani H, Lygerou Z, Nishimoto T, Nurse P (2000) The Cdt1 protein is required to license DNA for replication in fission yeast. *Nature* **404**: 625-628
- O'Donnell M, Kuriyan J, Kong XP, Stukenberg PT, Onrust R (1992) The sliding clamp of DNA polymerase III holoenzyme encircles DNA. *Mol Biol Cell* **3**: 953-957
- O'Reilly DR, Miller, L., Luckow, V.A. (1992) *Baculovirus expression vectors: a laboratory manual*, New York: W.H. Freeman and Company.
- Ogura T, Whiteheart SW, Wilkinson AJ (2004) Conserved arginine residues implicated in ATP hydrolysis, nucleotide-sensing, and inter-subunit interactions in AAA and AAA+ ATPases. *J Struct Biol* **146**: 106-112
- Ohtani K, DeGregori J, Leone G, Herendeen DR, Kelly TJ, Nevins JR (1996) Expression of the HsOrc1 gene, a human ORC1 homolog, is regulated by cell proliferation via the E2F transcription factor. *Mol Cell Biol* **16**: 6977-6984
- Owens JC, Detweiler CS, Li JJ (1997) CDC45 is required in conjunction with CDC7/DBF4 to trigger the initiation of DNA replication. *Proc Natl Acad Sci U S A* **94**: 12521-12526
- Pacek M, Tutter AV, Kubota Y, Takisawa H, Walter JC (2006) Localization of MCM2-7, Cdc45, and GINS to the site of DNA unwinding during eukaryotic DNA replication. *Mol Cell* **21**: 581-587
- Pacek M, Walter JC (2004) A requirement for MCM7 and Cdc45 in chromosome unwinding during eukaryotic DNA replication. *EMBO J* **23**: 3667-3676
- Pape T, Meka H, Chen S, Vicentini G, van Heel M, Onesti S (2003) Hexameric ring structure of the full-length archaeal MCM protein complex. *EMBO Rep* **4**: 1079-1083
- Park JH, Bang SW, Jeon Y, Kang S, Hwang DS (2008) Knockdown of human MCM10 exhibits delayed and incomplete chromosome replication. *Biochem Biophys Res Commun* **365**: 575-582
- Patel SS, Donmez I (2006) Mechanisms of helicases. *J Biol Chem* **281**: 18265-18268
- Patzelt H, Rudiger S, Brehmer D, Kramer G, Vorderwulbecke S, Schaffitzel E, Waitz A, Hesterkamp T, Dong L, Schneider-Mergener J, Bukau B, Deuerling E (2001) Binding specificity of Escherichia coli trigger factor. *Proc Natl Acad Sci U S A* **98**: 14244-14249
- Pennock GD, Shoemaker C, Miller LK (1984) Strong and regulated expression of Escherichia coli beta-galactosidase in insect cells with a baculovirus vector. *Mol Cell Biol* **4**: 399-406
- Petersen BO, Wagener C, Marinoni F, Kramer ER, Melixetian M, Lazzerini Denchi E, Gieffers C, Matteucci C, Peters JM, Helin K (2000) Cell cycle- and cell growth-regulated proteolysis of mammalian CDC6 is dependent on APC-CDH1. *Genes Dev* **14**: 2330-2343

- Piatti S, Bohm T, Cocker JH, Diffley JF, Nasmyth K (1996) Activation of S-phase-promoting CDKs in late G1 defines a "point of no return" after which Cdc6 synthesis cannot promote DNA replication in yeast. *Genes Dev* **10**: 1516-1531
- Poddar A, Roy N, Sinha P (1999) MCM21 and MCM22, two novel genes of the yeast *Saccharomyces cerevisiae* are required for chromosome transmission. *Mol Microbiol* **31**: 349-360
- Poplawski A, Grabowski B, Long SE, Kelman Z (2001) The zinc finger domain of the archaeal minichromosome maintenance protein is required for helicase activity. *J Biol Chem* **276**: 49371-49377
- Pospiech H, Grosse F, Pisani FM (2010) The initiation step of eukaryotic DNA replication. *Subcell Biochem* **50**: 79-104
- Pucci B, De Felice M, Rocco M, Esposito F, De Falco M, Esposito L, Rossi M, Pisani FM (2007) Modular organization of the *Sulfolobus solfataricus* mini-chromosome maintenance protein. *J Biol Chem* **282**: 12574-12582
- Pucci B, De Felice M, Rossi M, Onesti S, Pisani FM (2004) Amino acids of the *Sulfolobus solfataricus* mini-chromosome maintenance-like DNA helicase involved in DNA binding/remodeling. *J Biol Chem* **279**: 49222-49228
- Pursell ZF, Isoz I, Lundstrom EB, Johansson E, Kunkel TA (2007) Yeast DNA polymerase epsilon participates in leading-strand DNA replication. *Science* **317**: 127-130
- Randell JC, Fan A, Chan C, Francis LI, Heller RC, Galani K, Bell SP (2010) Mec1 is one of multiple kinases that prime the Mcm2-7 helicase for phosphorylation by Cdc7. *Mol Cell* **40**: 353-363
- Remus D, Beuron F, Tolun G, Griffith JD, Morris EP, Diffley JF (2009) Concerted loading of Mcm2-7 double hexamers around DNA during DNA replication origin licensing. *Cell* **139**: 719-730
- Ricke RM, Bielinsky AK (2004) Mcm10 regulates the stability and chromatin association of DNA polymerase- α . *Mol Cell* **16**: 173-185
- Rowles A, Chong JP, Brown L, Howell M, Evan GI, Blow JJ (1996) Interaction between the origin recognition complex and the replication licensing system in *Xenopus*. *Cell* **87**: 287-296
- Roy N, Poddar A, Lohia A, Sinha P (1997) The mcm17 mutation of yeast shows a size-dependent segregational defect of a mini-chromosome. *Curr Genet* **32**: 182-189
- Saha P, Chen J, Thome KC, Lawlis SJ, Hou ZH, Hendricks M, Parvin JD, Dutta A (1998a) Human CDC6/Cdc18 associates with Orc1 and cyclin-cdk and is selectively eliminated from the nucleus at the onset of S phase. *Mol Cell Biol* **18**: 2758-2767
- Saha P, Thome KC, Yamaguchi R, Hou Z, Weremowicz S, Dutta A (1998b) The human homolog of *Saccharomyces cerevisiae* CDC45. *J Biol Chem* **273**: 18205-18209
- Sanger F, Nicklen S, Coulson AR (1977) DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc Natl Acad Sci U S A* **74**: 5463-5467
- Sangrithi MN, Bernal JA, Madine M, Philpott A, Lee J, Dunphy WG, Venkitaraman AR (2005) Initiation of DNA replication requires the RECQL4 protein mutated in Rothmund-Thomson syndrome. *Cell* **121**: 887-898
- Sansam CL, Cruz NM, Danielian PS, Amsterdam A, Lau ML, Hopkins N, Lees JA (2010) A vertebrate gene, *ticrr*, is an essential checkpoint and replication regulator. *Genes Dev* **24**: 183-194
- Sato M, Gotow T, You Z, Komamura-Kohno Y, Uchiyama Y, Yabuta N, Nojima H, Ishimi Y (2000) Electron microscopic observation and single-stranded DNA binding activity of the Mcm4,6,7 complex. *J Mol Biol* **300**: 421-431

- Schagger H, von Jagow G (1987) Tricine-sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis for the separation of proteins in the range from 1 to 100 kDa. *Anal Biochem* **166**: 368-379
- Scheffzek K, Ahmadian MR, Kabsch W, Wiesmuller L, Lautwein A, Schmitz F, Wittinghofer A (1997) The Ras-RasGAP complex: structural basis for GTPase activation and its loss in oncogenic Ras mutants. *Science* **277**: 333-338
- Schein CH (1989) Production of soluble recombinant proteins in bacteria. *Bio/Technology* **7**: 1141-1149
- Schein CH, Nobeorn, M.H.M. (1988) Formation of soluble recombinant proteins in Escherichia coli is favored by lower growth temperature. *Bio/Technology* **6**: 291-294
- Schwacha A, Bell SP (2001) Interactions between two catalytically distinct MCM subgroups are essential for coordinated ATP hydrolysis and DNA replication. *Mol Cell* **8**: 1093-1104
- Shah D, Shaikh AR, Peng X, Rajagopalan R (2011) Effects of arginine on heat-induced aggregation of concentrated protein solutions. *Biotechnol Prog* **27**: 513-520
- Shcherbakova PV, Pavlov YI (1996) 3'-->5' exonucleases of DNA polymerases epsilon and delta correct base analog induced DNA replication errors on opposite DNA strands in Saccharomyces cerevisiae. *Genetics* **142**: 717-726
- Shechter DF, Ying CY, Gautier J (2000) The intrinsic DNA helicase activity of Methanobacterium thermoautotrophicum delta H minichromosome maintenance protein. *J Biol Chem* **275**: 15049-15059
- Singleton MR, Dillingham MS, Wigley DB (2007) Structure and mechanism of helicases and nucleic acid translocases. *Annu Rev Biochem* **76**: 23-50
- Smith GE, Fraser MJ, Summers MD (1983a) Molecular Engineering of the Autographa californica Nuclear Polyhedrosis Virus Genome: Deletion Mutations Within the Polyhedrin Gene. *J Virol* **46**: 584-593
- Smith GE, Summers MD, Fraser MJ (1983b) Production of human beta interferon in insect cells infected with a baculovirus expression vector. *Mol Cell Biol* **3**: 2156-2165
- Snyder M, He W, Zhang JJ (2005) The DNA replication factor MCM5 is essential for Stat1-mediated transcriptional activation. *Proc Natl Acad Sci U S A* **102**: 14539-14544
- Studier FW, Moffatt BA (1986) Use of bacteriophage T7 RNA polymerase to direct selective high-level expression of cloned genes. *J Mol Biol* **189**: 113-130
- Takahashi K, Yamada H, Yanagida M (1994) Fission yeast minichromosome loss mutants mis cause lethal aneuploidy and replication abnormality. *Mol Biol Cell* **5**: 1145-1158
- Takayama Y, Kamimura Y, Okawa M, Muramatsu S, Sugino A, Araki H (2003) GINS, a novel multiprotein complex required for chromosomal DNA replication in budding yeast. *Genes Dev* **17**: 1153-1165
- Tanaka S, Umemori T, Hirai K, Muramatsu S, Kamimura Y, Araki H (2007) CDK-dependent phosphorylation of Sld2 and Sld3 initiates DNA replication in budding yeast. *Nature* **445**: 328-332
- Tercero JA, Labib K, Diffley JF (2000) DNA synthesis at individual replication forks requires the essential initiation factor Cdc45p. *EMBO J* **19**: 2082-2093
- Thome KC, Dhar SK, Quintana DG, Delmolino L, Shahsafaei A, Dutta A (2000) Subsets of human origin recognition complex (ORC) subunits are expressed in non-proliferating cells and associate with non-ORC proteins. *J Biol Chem* **275**: 35233-35241

- Timmins J, McSweeney S (2006) XPB: An essential helicase involved in both transcription and repair of DNA. *Mol Cell* **22**: 149-150
- Todorov IT, Werness BA, Wang HQ, Buddharaju LN, Todorova PD, Slocum HK, Brooks JS, Huberman JA (1998) HsMCM2/BM28: a novel proliferation marker for human tumors and normal tissues. *Lab Invest* **78**: 73-78
- Treisman R, Ammerer G (1992) The SRF and MCM1 transcription factors. *Curr Opin Genet Dev* **2**: 221-226
- Tuteja N, Tuteja R (2004) Prokaryotic and eukaryotic DNA helicases. Essential molecular motor proteins for cellular machinery. *Eur J Biochem* **271**: 1835-1848
- Uchiyama M, Arai K, Masai H (2001) Sna41goa1, a novel mutation causing G1/S arrest in fission yeast, is defective in a CDC45 homolog and interacts genetically with polalpha. *Mol Genet Genomics* **265**: 1039-1049
- Valent QA, Kendall DA, High S, Kusters R, Oudega B, Lührink J (1995) Early events in preprotein recognition in E. coli: interaction of SRP and trigger factor with nascent polypeptides. *EMBO J* **14**: 5494-5505
- Vaughn JL, Goodwin RH, Tompkins GJ, McCawley P (1977) The establishment of two cell lines from the insect *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera; Noctuidae). *In Vitro* **13**: 213-217
- Velankar SS, Soutanas P, Dillingham MS, Subramanya HS, Wigley DB (1999) Crystal structures of complexes of PcrA DNA helicase with a DNA substrate indicate an inchworm mechanism. *Cell* **97**: 75-84
- Vincentelli R, Canaan S, Campanacci V, Valencia C, Maurin D, Frassinetti F, Scappucini-Calvo L, Bourne Y, Cambillau C, Bignon C (2004) High-throughput automated refolding screening of inclusion bodies. *Protein Sci* **13**: 2782-2792
- Volkening M, Hoffmann I (2005) Involvement of human MCM8 in prereplication complex assembly by recruiting hcdc6 to chromatin. *Mol Cell Biol* **25**: 1560-1568
- Waga S, Stillman B (1998) The DNA replication fork in eukaryotic cells. *Annu Rev Biochem* **67**: 721-751
- Walter J, Newport J (2000) Initiation of eukaryotic DNA replication: origin unwinding and sequential chromatin association of Cdc45, RPA, and DNA polymerase alpha. *Mol Cell* **5**: 617-627
- Wang G, Miskimins R, Miskimins WK (2000) Mimosine arrests cells in G1 by enhancing the levels of p27(Kip1). *Exp Cell Res* **254**: 64-71
- Warren EM, Huang H, Fanning E, Chazin WJ, Eichman BF (2009) Physical interactions between Mcm10, DNA, and DNA polymerase alpha. *J Biol Chem* **284**: 24662-24672
- Wohlschlegel JA, Dhar SK, Prokhorova TA, Dutta A, Walter JC (2002) Xenopus Mcm10 binds to origins of DNA replication after Mcm2-7 and stimulates origin binding of Cdc45. *Mol Cell* **9**: 233-240
- Yabuta N, Kajimura N, Mayanagi K, Sato M, Gotow T, Uchiyama Y, Ishimi Y, Nojima H (2003) Mammalian Mcm2/4/6/7 complex forms a toroidal structure. *Genes Cells* **8**: 413-421
- Yabuuchi H, Yamada Y, Uchida T, Sunathvanichkul T, Nakagawa T, Masukata H (2006) Ordered assembly of Sld3, GINS and Cdc45 is distinctly regulated by DDK and CDK for activation of replication origins. *EMBO J* **25**: 4663-4674
- Yan H, Gibson S, Tye BK (1991) Mcm2 and Mcm3, two proteins important for ARS activity, are related in structure and function. *Genes Dev* **5**: 944-957

- Yan H, Merchant AM, Tye BK (1993) Cell cycle-regulated nuclear localization of MCM2 and MCM3, which are required for the initiation of DNA synthesis at chromosomal replication origins in yeast. *Genes Dev* **7**: 2149-2160
- Yankulov K, Todorov I, Romanowski P, Licatalosi D, Cilli K, McCracken S, Laskey R, Bentley DL (1999) MCM proteins are associated with RNA polymerase II holoenzyme. *Mol Cell Biol* **19**: 6154-6163
- You Z, Ishimi Y, Masai H, Hanaoka F (2002) Roles of Mcm7 and Mcm4 subunits in the DNA helicase activity of the mouse Mcm4/6/7 complex. *J Biol Chem* **277**: 42471-42479
- You Z, Ishimi Y, Mizuno T, Sugasawa K, Hanaoka F, Masai H (2003) Thymine-rich single-stranded DNA activates Mcm4/6/7 helicase on Y-fork and bubble-like substrates. *EMBO J* **22**: 6148-6160
- Young JC, Agashe VR, Siegers K, Hartl FU (2004) Pathways of chaperone-mediated protein folding in the cytosol. *Nat Rev Mol Cell Biol* **5**: 781-791
- Zegerman P, Diffley JF (2007) Phosphorylation of Sld2 and Sld3 by cyclin-dependent kinases promotes DNA replication in budding yeast. *Nature* **445**: 281-285
- Zhang JJ, Zhao Y, Chait BT, Lathem WW, Ritzi M, Knippers R, Darnell JE, Jr. (1998) Ser727-dependent recruitment of MCM5 by Stat1alpha in IFN-gamma-induced transcriptional activation. *EMBO J* **17**: 6963-6971
- Zou L, Mitchell J, Stillman B (1997) CDC45, a novel yeast gene that functions with the origin recognition complex and Mcm proteins in initiation of DNA replication. *Mol Cell Biol* **17**: 553-563
- Zou L, Stillman B (1998) Formation of a preinitiation complex by S-phase cyclin CDK-dependent loading of Cdc45p onto chromatin. *Science* **280**: 593-596
- Zou L, Stillman B (2000) Assembly of a complex containing Cdc45p, replication protein A, and Mcm2p at replication origins controlled by S-phase cyclin-dependent kinases and Cdc7p-Dbf4p kinase. *Mol Cell Biol* **20**: 3086-3096

4. Anhang

Für die Sequenzalignments wurden die Sequenzen der folgenden NCBI-Zugriffsnummern verwendet:

<i>hsMCM2</i>	NP_004517.2	
<i>hsMCM3</i>	NP_002379.2	
<i>hsMCM4</i>	NP_005905.2	
<i>hsMCM5</i>	NP_006730.2	
<i>hsMCM6</i>	NP_005906.2	
<i>hsMCM7</i>	NP_005907.3	
<i>hsMCM8</i>	NP_115874.3	
<i>MthMCM</i>	NP_276876.1	
<i>SsoMCM</i>	CAB57529.1	
<i>DmeREC</i>	Q9VF30.2	(<i>Drosophila melanogaster</i> MCM8)
<i>XlMCM8</i>	NM_001095968.1	

Multiples Alignment der MCM-Proteine im Bereich der konservierten Domänen

hsMCM8	KPLCTKMAFLCAACGEIQSFPLPDGKYSLPKCPVPVCRGRSFT-----ALRSSPLTVT	285
XlMCM8	KPLCTKMAFSCNMCGDIQCFPLPDGKYTVPTKCPVPECGRGRSFT-----ANRSSPLTVT	235
hsMCM3	RPKVVRSVHYCPATKKTIERRYSDLTTLVAFPSSSSVYPTKDEEN----NPLETEYGLSVY	193
hsMCM7	KPKMVVATYTCDCQGAETYQPIQSPTFMPLIMCPSQECQTNRS-----GRLYLQTRGSRF	229
hsMCM6	HPELVSGTFLCLDCQTVIRDVEQQFKYQPNICRNPVCANRR-----RFLLDTNKSRF	200
hsMCM2	LPQLSMVKYCNCKNFVLGPFQSQNQE--VKPGSCPECQSAG-----PFEVNMEETIY	370
hsMCM5	RAKATRISIQCRSCRNTLTNIAMRPGLEGYALPRKCNTDQAGRPKCPLDPYFIMPDKCKC	221
hsMCM4	IPEMQEAFQCQVCAHTTRVEMDRGRIAEPSVGRCHTTHSMA-----LIHNRSLF	346
MthMCM	RPRIVKAVFEERG--CMRHHAVTQSTNM---ITEPSLCECGG-----RSFRLQDESEF	172
SsoMCM	KERIYKATYKHIHPDCMQEFEPEDDEEMFEVLEMTIICPKCGKP---GQFRLIPEKTKL	189
DmeREC	SYSLTWQAFRCSRCQMEIAMRQRTFQPRPYQCKRSECVARDEFV-----LRSSPYTRL	325

Zink-Finger

hsMCM8	MDWQSIKIQELMS-DDQREAGRIPTIECELVDLVDSCVPGDVTITGIVKVSNAEEG-	343
XlMCM8	VDWQTIKVQELMS-DDQREAGRIPTVECELIQDLVDSCVPGDMITVTGIVKVSNTDGG	294
hsMCM3	KDHQTITIQEMP---EKAPAGQLPRSDVILDDDLVDKAKPGDRVQVVGTYR-CLPGKKG	249
hsMCM7	IKFQEMKMQEHS---DQVPVGNIPRSITVLVEGENTRIAQPGDHVSVTGIFLPIRLTGFR	286
hsMCM6	VDFQKVRIQETQ---AELPRGSIPRSLEVILRAEAVESAQAGDKCDFTGTLIVVPDVKSL	257
hsMCM2	QNYQRIRIQESP---GKVAAGRLPRSKDAILLADLVDSCKPGDEIELTGIYHNNYDGS-L	426
hsMCM5	VDFQTLKLQELP---DAVPHGEMPRHMQLYCDRYLCKDVKVPGNRVTIMGIYSIKKFG--L	276
hsMCM4	SDKQMIKLQESP---EDMPAGQTPTHTVILFAHNDLVDKVQPGDRVNVGTGIYRAVPPIRVNP	403
MthMCM	LDTQTLKLQELP---ENLSGGEQPRQITVLEDDLVDLTLPGDIVRVVTGTLRTVRDE--R	227
SsoMCM	IDWQKAVIQERP---EEVPSGQLPRQLEIILEDDLVDLSARPGDRVKVTGILDIKQDS--P	244
DmeREC	SIRQIIRVEESSLNLVHDFETSMPEAMDVELRHDLVDAVRVGQEVVVVTGILKLQELGDDT	385

* : * * * : *

hsMCM8	SRNKNDK-----CMFLLYIEANSISNSKGQKTKSSEDG	376
XlMCM8	FKNKNNK-----CMFLLYIEANSVSNKSGQKSTEDS	327
hsMCM3	GYTSG-----TFRTVLIACNVQMSK-----DAQ	273
hsMCM7	QVVQG-----LLSETYLEAHRIVKMN-----KSE	310
hsMCM6	STPGARAETNSRVSGVDGYETEGIRGLRALGVRDLSYRLVFLACCVAPTNP-----RFG	311
hsMCM2	NTANGFP-----VFATVILANHVAKK-----DNK	450
hsMCM5	TTSRGRD-----RVGVGIRSSYIRVLGIQVDTDGSGR	308
hsMCM4	RVSNNKS-----VYKTHIDVIHYRKTDARLHGLDEE	435
MthMCM	TKR-----FKNFIYGNYTEFL-----EQE	246
SsoMCM	VKRGSR-----VFDIYMKVSSIEVS-----QKV	268
DmeREC	TTGDTSN-----QMOPYLKAVSIRDASS-----	408

hsMCM8	CKHGMLEFSLKDLY-----AIQEIQAEE	427
XlMCM8	GNHGASMDFLKDLY-----AIQEIQSQEN	378
hsMCM3	PSFSAEDIAKIKKFS-----KTRSKD	320
hsMCM7	DDESGAGELTREELR-----QIAEED	357
hsMCM6	GKELRDEEQTAESIKNQMTVKEWEKVFEMSQDKNLYHNLCSTSLFPTIHGNDEVKRGVLLM	371
hsMCM2	VAVGELTDEDVKMIT-----SLSKDQ	498
hsMCM5	SFAGAVSPQEEEFER-----RLAALP	356
hsMCM4	AEQKLFSEKRVELLK-----ELSRKP	483
MthMCM	FEELQISEEDEEKIK-----ELAGDP	294
SsoMCM	LDEVIISEEDEKKIK-----DLAKDP	316
DmeREC	-IKREFSERDLEAIV-----MINAEP	455

: : . : : * : . *

MCM-Domäne

hsMCM8	LFGGSQKYADDKNRIPIRGDPHILVV	487
XlMCM8	LFGGCQKYADDKNRIPIRGDPHILVV	438
hsMCM3	LLGG--VERDLENGSHIRGDINILLI	378
hsMCM7	LVGG--VDQSPR-GMKIRGNINILCG	414
hsMCM6	LFGG--VPKTTGEGTSLRGDINVCIV	429
hsMCM2	LFGGEPKPN--GGKHKVRGDINVLLC	556
hsMCM5	LFGGSRKRL--PDGLTRRGDINLLML	414
hsMCM4	LFGGTRKDFSHTRGKFRAGINILCG	543
MthMCM	LFGG--TGKELDDKTRLRGDIHILIV	352
SsoMCM	LFGG--VPKVLED-TRIRGDIHILII	373
DmeREC	LLGG-----KGAETEAINVLLV	506

*. ** : : : * * . * : : *

Walker-A-Motiv

[illegible]

MCM-Signaturmotiv

[illegible]

Arginin-Finger

$$\begin{array}{ccccccc} \cdot & \cdot & & * & \cdot & \cdot & \cdot \\ \cdot & \cdot & \cdot & & \cdot & & \cdot \end{array}$$
[illegible]

142

Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich bei all denen bedanken, die mir die Anfertigung dieser Arbeit ermöglicht und mich bei ihrer Ausführung unterstützt haben.

Diese Arbeit wurde von September 2005 bis Juni 2009 unter Anleitung von Prof. Dr. Georg Lipps am Lehrstuhl für Biochemie der Universität Bayreuth und am Fritz-Lipmann-Institut bei Dr. Helmut Pospiech in der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Frank Grosse in Jena angefertigt.

Bei Prof. Dr. Georg Lipps möchte ich mich für die interessante und herausfordernde Themenstellung, die ausgezeichnete wissenschaftliche Betreuung und die gewährten Freiheiten bei der Bearbeitung bedanken.

Bei Prof. Dr. Franz-Xaver Schmid bedanke ich mich für die freundliche Übernahme des Zweitgutachtens.

Prof. Dr. Krauss danke ich für die Möglichkeit, die Arbeiten an seinem Lehrstuhl durchzuführen, für sein Interesse am Fortgang der Arbeit sowie den einen oder anderen hilfreichen Fingerzeig.

Bei Prof. Dr. Grosse bedanke ich mich für die Möglichkeit, in seiner Arbeitsgruppe einen wichtigen Teil meiner Arbeit durchführen zu können.

Dr. Helmut Pospiech danke ich für die Betreuung meiner Arbeit in Jena, für seinen Enthusiasmus für seine unzähligen guten Einfälle.

Bei Prof. Dr. Schobert und Prof. Dr. Unverzagt bedanke ich mich für die Möglichkeit, Ihre Zellkultur-Sterilwerkbänke zu benutzen.

Des Weiteren bedanke ich mich bei meinen Kolleginnen und Kollegen Martin Sanchez, Kristina Kufner, Han Dong, Kirsten Beck und Silvia Berkner aus Bayreuth sowie Katja Nitschke, Christian Usskilat, Jeanette Knoll, Claudia und Annerose Schneider aus Jena für die angenehme Arbeitsatmosphäre, die Hilfsbereitschaft und die Ablenkung vom Laboralltag.

Ein besonderer Dank gilt meinem Mann Wolf Holtkamp, nicht nur für das Korrekturlesen dieser Arbeit, sondern auch für seine zuverlässige Unterstützung in allen Lebenslagen und für so vieles mehr. Meinem kleinen Sohn Mathis danke ich für seine Fröhlichkeit und seine Unbekümmertheit, die mein Leben über den Arbeitsalltag hinaus um ein vielfaches bereichert haben.

Auch allen anderen, die zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben und die hier nicht erwähnt wurden, sei mein Dank gewiss!

Erklärung

Hiermit erkläre ich, dass ich die Arbeit selbstständig verfasst und keine anderen als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel verwendet habe.

Ferner erkläre ich, dass ich nicht anderweitig mit oder ohne Erfolg versucht habe, diese Dissertation einzureichen. Ich habe keine gleichartige Doktorprüfung an einer anderen Hochschule endgültig nicht bestanden.

Bayreuth, den 29. April 2011



(Linda Holtkamp)